

**Molekuláris adjuvánsok, azaz
az immunválasz szabályozása
rekombináns egyláncú ellenanyagokkal történő
antigénirányítással**

Kálmán-Szekeres Zsuzsanna

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola
Immunológia Program

Programvezető: Prof. Erdei Anna
Témavezető: Dr. Prechl József, M.D., PhD
tudományos főmunkatárs

ELTE, Immunológiai Tanszék,
Budapest

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2.
Rövidítésjegyzék	5.
I. Irodalmi áttekintés	
I.1. Vakcinák és adjuvánsok fejlesztésének irányai	7.
I.2. Az immunválasz szabályozása az antigénprezentáló sejtek célzásával	
I.2.1. Az antigénprezentáló sejtek szerepe az immunválasz kialakításában	8.
I.2.2. Az APC-k célzásának fő irányvonalai	10.
I.2.3. Az egér komplement receptor 1 és 2	
I.2.3.1. AzmCR1/2 szerkezete és funkciói	12.
I.2.3.2. Az mCR1/2 stimulálásának stratégiai és hatása az immunválasz alakulására	13.
I.2.4. Az egér FcγR-ok	
I.2.4.1. Az egér FcγR-ok szerkezete és funkciói	14.
I.2.4.2. Az egér FcγR-ok stimulálásának stratégiai és hatása az immunválasz alakulására	16.
I.2.5. Az egér CD40 receptor	
I.2.5.1. Az egér CD40 receptor szerkezete és funkciói	18.
I.2.5.2. Az egér CD40 receptor célzása	19.
I.3. A rekombináns egyláncú ellenanyagok és alkalmazásuk APC-k célzására	20.
I.4. Mikrogyöngyök alkalmazása adjuvánsként	23.
II. Célkitűzések	25.
III. Anyagok és módszerek	
III.1 Anyagok	26.
III.2. Módszerek	
III.2.1. Az FGK egyláncú ellenanyag előállítása	29.
III.2.1.1 Az immunglobulin könnyű- és nehézláncának klónozása	29.
III.2.1.2. A polimeráz láncreakció (PCR)	32.
III.2.1.3. DNS elektroforézis agaróz gélben	32.
III.2.1.4. Restrikciós endonuklázzal való emésztés	33.
III.2.2. Az FGK scFv termelésének ellenőrzése dot blotl	33.
III.2.3. Az scFv termelése és tisztítása	34.

III.2.4. Az FGK scFv illetve az scFv tartalmú célzó komplexek jellemzése	
<i>in vitro</i> és <i>in vivo</i>	35.
III.2.4.1. Sejtvonalak és egerek kezelése	35.
III.2.4.2. Csontvelői eredetű dendritikus sejtek differenciáltatása, illetve nyirokcsomó és lép sejtuszupenziók készítése	35.
III.2.4.3. Áramlási citofluorimetria	36.
III.2.4.4. Az scFv-k biotinizálása és sztreptavidinnel való konjugálása	37.
III.2.4.5. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	38.
III.2.4.6. Az egerek immunizálása	39.
III.2.4.7. Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia	40.
III.2.4.8. Komplement aktiváció mérése mikrogyöngyökön	41.
III.2.4.9. ELISA	41.
III.2.4.10. ELISPOT	42.
III.2.4.11. Reverz fehérje mikroarray	43.
III.2.4.12. Statisztikai elemzések	43.
IV. Eredmények	
IV.1. Az anti-egér CD40 rekombináns egyláncú ellenanyag létrehozása	44.
IV.1.1. Az FGK45.5 immunglobulin könnyű- és nehézlánc variábilis doménjeinek klónozása	45.
IV.1.2. Az egyláncú ellenanyag DNS szintű meglétének igazolása	46.
IV.1.3. Az egyláncú ellenanyag fehérje szintű meglétének igazolása	48.
IV. 1.4. Az FGK scFv kötődésének jellemzése A20 sejtvonalon és primer sejteken	50.
IV.1.5. Az FGK scFv kompetál az eredeti FGK45.5 ellenanyaggal a CD40 receptorhoz való kötődésben	53.
IV.2. Az scFv-k által irányított célzó komplexek kötődésének jellemzése	56.
IV.2.1. A sztreptavidin (SA) alapú célzó komplexek kötődésének jellemzése	56.
IV.2.2. Két különböző scFv-t tartalmazó sztreptavidin alapú komplexek kimutatása	59.
IV.2.3. A sztreptavidinnel fedett mikrogyöngy (msSA) tartalmú komplexek jellemzése	61.

IV.3. A humorális immunválasz befolyásolása egyláncú ellenanyagokkal irányított antigének segítségével	67.
IV.3.1. Szuboptimális antigéndózis melletti immunizációs mód kiválasztása	68.
IV.3.2. A kis affinitású FcγRII/III és a CR1/2 receptorokhoz való antigén irányítás hatása a humorális immunválaszra	68.
IV.3.2.1. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése ELISA, illetve ELISPOT módszerekkel	70.
IV.3.2.2. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése reverz array módszerrel	72.
IV.3.3. A CD40 és kis affinitású FcγRII/III receptorokhoz irányított antigén hatása a humorális immunválaszra	72.
IV.3.3.1. Az immunizáció hatása az APC-k aktivációjára	72.
IV.3.3.2. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése ELISA módszerrel	74.
IV.3.3.3. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz elemzése reverz ELISPOT és reverz mikroarray segítségével	75.
IV.3.3.4. A mikrogöngyök képesek kiváltani a komplement fehérjék aktivációját	80.
V. Diskusszió	82.
VI. Összefoglalás	89.
VII. Summary	90.
VIII. Irodalomjegyzék	91.
Köszönetnyilvánítás	105.
Publikációs lista	106.

Rövidítésjegyzék

AEC: 3-amino-9-etilkarbazol	FACS: áramlási citofluoriméter
APC: antigénprezentáló sejt (antigen-presenting cell)	(Fluorescence activated cell sorter)
APS: ammonium-perszulfát	FCS: főtális borjú szérum (Fetal calf serum)
BCR: B-sejt receptor (B Cell Receptor)	FDC: follikuláris dendritikus sejt
BMDC: csontvelői eredetű sejtekből differenciáltatott DC (bone marrow-derived DC)	FcγRII/III: II és III típusú gG Fc-részét kötő receptor II és III
DC: dendritikus sejt (dendritic cell)	FITC: fluoreszcein izotiocianát
BSA: borjú szérum albumin (Bovine Serum Albumin)	GM-CSF: granulocita és makrofág kolóniasztimuláló faktor (granulocyte- macrophage colony stimulating factor)
C3 és C4: 3-as és 4-es komplement fehérje	HRP: tormaperoxidáz enzim (Horse-Radish Peroxidase)
CDR: hipervariábilis régió (Complementarity-determining region)	IC: immunkomplex
CpG oligonukleotid: metilálatlan CG motívumot traktalmazó oligonukleotid	Ig: immunglobulin
CR1: Komplement Receptor 1 (Complement Receptor 1)	ICAM-1: sejtadhéziós molekula (Inter- Cellular Adhesion Molecule 1)
CR2: Komplement Receptor 2 (Complement Receptor 2)	IPTG: izopropil-β-D-riogalaktopiranozid
DEC-205: dendritikus sejteken és epiteliális sejteken megjelenő receptor (dendritic and epithelial cells, 205 kDa)	LB médium: Luria-Bertani médium
DC: dendritikus sejt (dendritic cell)	LyVE-1: sejt felszíni struktúra a limfatikus endotél sejteken (lymphatic vascular endothelial cell)
DNS: dezoxiribóznukleinsav	MARCO: kollagén szerkezetű makrofág receptor (macrophage receptor with collagenous structure)
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav	MHCI: major histocompatibility complex I
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	MHCII: major histocompatibility complex II
ELISPOT: Enzyme-linked immunosorbent spot assay	OVA: ovalbumin
	PAGE: Poliakrilamid gélelektroforézis
	PE: fikoeritrin (phycoerythrin)
	PBS: foszfát puffer (phosphat buffered saline)

PCR: polimeráz láncreakció (*Polymerase Chain Reaction*)

RNS: ribonukleinsav

SA: sztreptavidin

scFv: rekombináns egyláncú ellenanyag fragmentum (*single chain Fragment variable*)

SCR: rövid ismétlődő szekvencia (*short consensus repeat*)

SDC: Na-dezoxikolát

SDS: Na-dodecil-szulfát

SLS: Na-lauril-szarkozin

TEMED: N,N,N,N-tetrametilén-diamin

TI: T-sejt független aktiváció (*T-cell independent*)

v/v%: térfogat százalék (*volume/volume*)

w/v%: vegyes százalék (*weight/volume*)

VH : Immunglobulin nehéz lánc variábilis régió

VL : Immunglobulin könnyű lánc variábilis régió

I. Irodalmi áttekintés

I.1. Vakcinák és adjuvánsok fejlesztésének irányai

Az immunrendszer egyik alapvető feladata a szervezetbe került kórokozók, idegen anyagok felismerése, elpusztítása és hosszantartó védettség kialakítása az újr fertőzöttség elkerüléséhez. Az orvosi terápiában alkalmazott vakcinák, oltóanyagok célja szintén a fajlagos és aktív, memória válasszal is járó immunitás előidézése a szervezetben egy adott kórokozó ellen, megelőzve vagy kezelve a már kialakult betegségeket. A legkorábbi oltóanyagok legyengített vagy elölt kórokozókat tartalmaztak, vagy azok toxinjainak módosított, nem mérgező változatait (diftéria vagy tetanusz elleni vakcina). Ezek a típusú oltóanyagok, a kórokozók többféle antigénjét tartalmazva, legtöbbször hatékony immunválaszt váltottak ki, ugyanakkor az esetenként fellépő mellékhatások csökkentése és elkerülése miatt a vakcinafejlesztés újabb iránya az olyan oltóanyagok előállítás lett, amely az elölt kórokozók helyett azok darabjait vagy antigénjeinek rekombináns formáját (alegység vakcinák) tartalmazza (1;2). A rekombináns antigének alkalmazása lehetővé teszi az oltóanyag összetételének pontos meghatározását, ami hozzájárul a biztonságos felhasználásukhoz. Emellett a minőségük biztosítása is szabályozottabb a rekombináns technikáknak köszönhetően, mint a teljes kórokozókat tartalmazóké, amelyeknél az egyes termékek minősége között akadhatott széles eltérés, kedvezőtlen vagy ártalmas mellékhatásokat okozva (3;4). Ugyanakkor a rekombináns antigének számos esetben gyengébb immunogenitásuk egy teljes kórokozóhoz képest, gyorsabban kiürülnek a szervezetből, vagy nem megfelelően kerülnek bemutatásra az immunsejteknek, így vagy nem, vagy csak többszöri oltást követően váltanak ki hatékony immunreakciót. A probléma kiküszöböléséhez széles körben használnak alegység vakcináknál a rekombináns antigének mellett úgynevezett adjuvánsokat, azaz önmagukban nem specifikus reakciót kiváltó, immunválaszt fokozó vagy moduláló hatású reagenseket.

Az adjuvánsok egy részének hatásmechanizmusa azon alapszik, hogy az antigéneket körülvevő úgynevezett depót képeznek az oltás helyén, amelyből azok lassabban felszabadulva hosszantartó vagy ismételt aktivációra készítetik az immunsejteket (5). Ilyen a víz-olaj alapú komplet, illetve inkomplet Freund adjuváns, amelyek erős lokális gyulladási folyamatokat is kiváltanak az oltás helyén, növelve a velük együtt bejuttatott antigének immunogenitását (6;7). Szintén főleg ezen alapul az alumínium sókat tartalmazó alum hatása is, amely ma az egyetlen humán felhasználásra általánosan elterjedt adjuváns, mivel nem okoz mellékreakciókat, bár hatása elmarad az előbbiektől (8). Újabb eredmények szerint az

alum a depó formáláson kívül bizonyos, az úgynevezett Nalp3 jelátviteli tömb kialakulását kiváltó receptorok aktivációján keresztül is hat egyes fagocita sejteknél (9;10). Régóta kutatják humán felhasználásra a szkvalén alapú olaj-víz emulziókat, pl. MF59 nevű adjuvánt (11;12), vagy a Quil A (*Quillaja saponaria*) szaponin tartalmú adjuvánsokat is (13). Az adjuvánsok egy másik nagy körét adják a virális, illetve a bakteriális mérettartományba eső nano- és mikrorészecskék. Ezek közül a legismertebbek a 20-200 nm átmérőjű vírus-szerű partikulumok (VLP,), az úgynevezett ISCOM immunstimuláló komplexek, azaz Quil A fehérje tartalmú liposzómák, valamint egyéb 100-200 nm méretű liposzómák, és a szervezetben lebomló (pl. PLA: politejsav vagy PLGA: politejsav-glikolsav alapú) vagy nem lebomló (pl. polisztirol vázú) 0,2-5 µm-es mikrogöngyök (14). A partikulumok immunválaszt fokozó hatása elsősorban a méretüknek köszönhető, ugyanis a vírus vagy baktérium méretű testeket a fagocita sejtek, úgymint a dendritikus sejtek (DC) és a makrofágok, hatékonyan felveszik, és a hozzájuk kapcsolt antigéneket is feldolgozzák és bemutatják (1;15;16). A nagyobb (>100 nm) mikropartikulumok hatása kiegészül azzal, hogy depót is képeznek az oltás helyén, mivel számukra a nyirokerekek és a szövetek nem átjárhatóak (17;18). A nano- és mikropartikulumok alkalmazásának hátránya, hogy könnyen aggregálódnak, így az oltóanyag nem homogén, és az összetételének pontos követhetősége sérül.

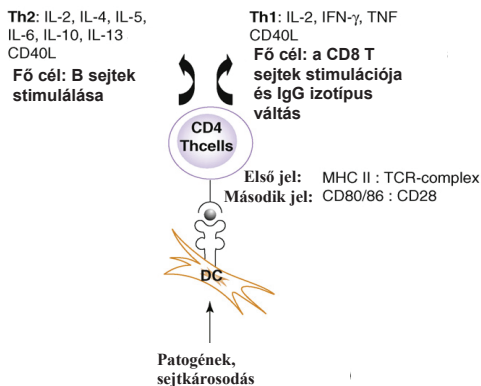
Az adjuvánsok legújabb generációját az úgynevezett molekuláris adjuvánsok alkotják; olyan fehérjék – pl. citokinek, toll-szerű receptor ligandumok illetve agonista ellenanyagok és ellenanyag fragmentumok - vagy poliszaharidok vagy oligonukleotidok, amelyek közvetlenül az antigénprezentáló sejtek (APC) - azaz a DC-k, a makrofágok és a B-sejtek – patogén felismeréséhez és felvételéhez, vagy aktivációjához szükséges receptorokra hatnak (19). Ezen adjuvánsok nagy előnye, hogy az APC-ket célzottan, receptor közvetített módon aktiválják, amely hatékony, mégis kevesebb mellékreakcióval jár, szemben pl. a depóképzéssel ható adjuvánsokkal. Munkánk egyik célja ilyen molekuláris adjuvánsok fejlesztése volt.

1.2. Az immunválasz szabályozása az antigénprezentáló sejtek célzásával

1.2.1. Az antigénprezentáló sejtek szerepe az immunválasz kialakításában

A hatékony immunválasz kialakulásához elengedhetetlen az adaptív immunrendszer elemeinek, a T- és a B-limfocitáknak aktivációja az antigén megjelenésekor. Mindkét sejttípus nagy varianciát mutató, specifikus antigén-kötő receptorral bír, amellyel nemcsak

fehérje, hanem - a B-sejteknek köszönhetően - lipid, szénhidrát vagy nukleinsav természetes struktúrákkal is kapcsolódni tud. Míg a B-sejtek önállóan képesek az antigének megkötésére a B-sejt receptorokon át, addig a T-sejtek antigénkötése az APC-k által feldolgozott, majd MHCI illetve MHCII molekulákon bemutatott peptidekre korlátozódik (20). Az APC-k egyik fontos szerepe tehát a kórokozó megjelenésekor az antigének gyors és hatékony felvétele és bemutatása T-sejteknek MHCI vagy MHCII fehérjékhez kapcsoltn (1. ábra).



1. ábra: Az antigénprezenáló sejtek fontos szerepe az antigénspecifikus T-sejtek aktiválása, amely elengedhetetlen a hatékony immunválasz kialakulásához. Az aktivált T-sejtek többek között differenciálódhatnak az elsősorban gyulladásos folyamatokat és a citotoxikus T-sejtek aktivációját szabályozó Th1 sejtekké, vagy az ellenanyagtermelést segítő és a gyulladásos folyamatokat gátló citokineket termelő Th2 effektor T-sejtekké is. A DC-ken kívül a B-sejtek és a makrofágok is képesek a T-sejteknek antigént bemutatni. (Kép forrása: Trends in immunology Vol.27,573-579, Reddy ST et al.)

Az antigén felvétele fagocitózissal vagy receptor-közvetített úton történhet; utóbbi esetben a patogén mintázatfelismerő receptorok, vagy az antigéneket immunkomplex formában (IC) - azaz specifikus ellenanyagokkal és aktivált komplement fragmentumokkal opsonizált - felvevő receptorok játszanak szerepet. Ez utóbbiak közé az immunglobulin (Ig) Fc- részét kötő receptorok (FcR) és a komplement receptorok tartoznak. A T- és B-sejtek hatékony aktivációjához az antigént felismerő receptorok keresztkötése ugyanakkor nem elég, további kostimulációs jelek is szükségesek, amelyeket szintén az APC-k biztosítanak a

T-sejteknek, egyes adhéziós (pl. ICAM-1) fehérjék és kostimulátor receptorok (CD40, CD80, CD86, CD134, CD137) fokozott expressziójával, illetve citokinek és kemokinek termelésével (1. ábra). Az aktivált és polarizálódott effektor CD4+ T-sejtek citokin termelése pedig szabályozza az APC-k differenciációját és az ellenanyagtermelést, csakhogy, mint a CD8+ T-sejtek általi celluláris immunválaszt, továbbá a memória válasz létrejöttét.

1.2.2. Az APC-k célzásának fő irányvonalai

Számos tanulmány foglalkozik az APC-k közvetlen stimulálásával antigének jelenlétében. Ismert, hogy antigén adása mellett a Toll-szerű receptorok (TLR) stimulálása pl. CpG (21), vagy LPS (22), vagy hősokkfehérje (23) segítségével, fokozza az antigén immunogénitását, viszont esetenként szöveti károsodásokhoz vezethet. Ezzel szemben az antigének irányítása MHCII receptorokhoz (24;25) egyértelműen adjuváns hatásának bizonyult jelentősebb mellékhatások nélkül. Az egyik ideális stratégia tehát az immunválasz fokozásához az APC-k antigénfelvételének elősegítése. Az IC felvételében az APC-ken többek között az IgG Fc részét kötő kis affinitású receptor II (az FcγRII, CD32) és III (FcγRIII, CD16), illetve a komplement fragmentumokat kötő komplement receptor 1 (CR1, CD35) és 2 (CR2, CD21) játszik szerepet, amely receptorok is ideális jelöltek lehetnek az antigének felvételének fokozásához.

A másik stratégia az APC-k kostimulációs receptorainak, úgy mint a CD40, a CD134 (OX40), a CD137 (4-1BB), a CD80 vagy a CD86 aktiválása (26), illetve citokinek alkalmazása (27;28) az oltóanyagban. Ennek a stratégiának az előnye, hogy a kostimulációs receptorok aggregációjával induló jelátviteli folyamatok pozitívan szabályozzák az APC-k érését és így további kostimulációs képességüket erősítik, amelyek elengedhetetlenek a hatékony T- és B-sejtes immunválaszhoz. A CD40 receptor célzása a legáltalánosabban elterjedt, mivel ez a receptor minden APC-n konstitutívan jelen van, és régebb óta kutatott a többi említett kostimulátorhoz képest.

Kevés olyan kutatás ismert jelenleg, ahol a két stratégiát ötvöznék, vagy amely egyszerre több receptor együttes aktivációjával kívánna elérni az immunválasz modulációját, holott a szervezetbe bekerülő patogének több különböző receptor együttes aktivációjával váltják ki az elpusztításukhoz kellő immunválaszt.

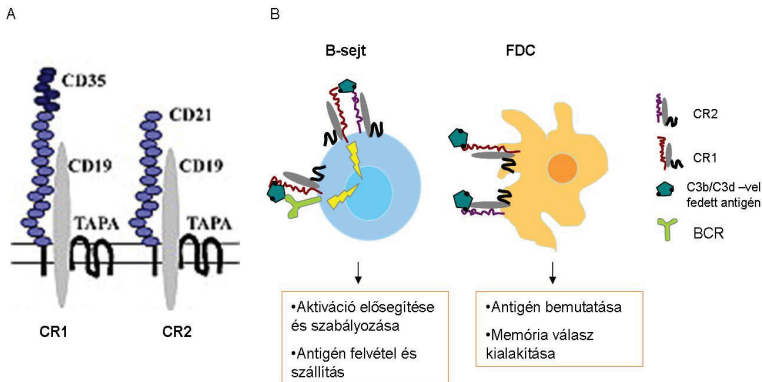
1.2.3. Az egér komplement receptor 1 és 2

1.2.3.1. Az mCR1/2 szerkezete és funkciói

Az egér Komplement receptor 1 és Komplement receptor 2 (mCR1, mCR2) a komplement fragmentumok megkötéséért felelősek, és elsősorban B-sejteken valamint folliculáris DC-ken (FDC) fejeződnek ki (29), de aktivált T-sejtek is képesek a receptorok expressziójára (30;31). Az mCR1 természetes liganduma a C3b, a C4b és az iC3b komplement fehérje fragmentumok, míg az mCR2 C3d és C3dg kötőhelyet tartalmaz (32-34). Az mCR1-t és mCR2-t is ugyanaz a gén kódolja, és alternatív átíródás útján képződik a két külön receptor (35). Az mCR1 extracelluláris részén 21 db úgynevezett „short consensus repeats”, SCR szekvenciát hordoz. Ettől az mCR2 szerkezete csak annyiban tér el, hogy az első hat, N terminális részen lévő SCR hiányzik (36;37) (2. ábra A). A C3d kötőhelyét az mCR2 N terminális első két SCR-jében lokalizálták (38), míg a C3b kötéséért az mCR1 első két SCR-je felelős (33). Mivel ezen a különbségen kívül a két receptor teljesen megegyezik, az mCR2 ellenes monoklonális ellenanyagok többsége az mCR1-t is felismeri (39), így az irodalomban sokszor a CR1/2 receptor megjelölést használják, nem különítve el a két receptort. A két receptornál a transzmembrán és az intracelluláris részek is azonosak, feltehetően ugyanazokkal a sejten belüli fehérjékkel asszociálnak a jelátvitel során, és a funkciójuk is hasonló.

A B-sejteken az mCR1/2 receptorok a CD19-cel, és az ehhez kapcsolódó CD81 molekulával asszociált formában vannak jelen, amelynek bizonyítéka, hogy CD19 ellenes antitestekkel precipitálhatóak (40). A CR2-ről kimutatták, hogy a CD19-el együtt, koreceptorként működnek a BCR mellett: a C3d fragmentumot és antigént tartalmazó komplexek a BCR és a CR2 receptor keresztkötésével a B-sejtek aktivációs küszöbét csökkentették (41;42), lehetővé tévve az aktivációt kis mennyiségű antigének jelenlétében is.

Az mCR1/2 további funkciója B-sejteken a komplement fragmentumokat tartalmazó antigének, IC-k szállítása a nyirokcsomók szubkapszuláris szinuszának, illetve a lép marginális zónájának területéről az FDC-khez (43) (2. ábra B). Az FDC-ken lévő CR1/2 szerepe az IC-k megkötése és bemutatása a B-sejtek felé, elősegítve ezáltal a B-sejtek ellenanyagtermelését, affinitásérését, és a memória B-sejtek kialakulását is (44;45).



2. ábra: Az mCR1/2 szerkezete és funkciói. (A) Az mCR1 21 db, az mCR2 15 db SCR egységből épül fel, és mindkettő a CD81 (TAPA), illetve a CD19 fehérjéhez kapcsoltnak jelennek meg a sejtek felszínén. (Kép forrása: Mol Immunol. 2009 Sep;46(14)). (B) Az mCR1/2 a B-sejteken koreceptoroként működve elősegíti a B-sejt receptorán keresztül történő aktivációját. Továbbá szerepük van az IC-k szállításában, felvételében és az FDC-ken a sejtfelszíni megtartásukban is a memória válasz kialakításához.

Az mCR1/2 mind a B-sejteken, mind az FDC-ken elengedhetetlen a hatékony T-sejt függő B-sejtes válasz kialakulásához (29), amelyet bizonyít, hogy CR1/2 hiányos egerek vagy CR1/2-t alacsony szinten kifejező (hipomorf) egerek immunizációjakor nem történik meg, vagy nem tökéletes a germinális centrumok kialakulása, és sérül az ellenanyagok affinitásérése valamint izotípusváltása (46-48). A CR1 ezen kívül szerepet játszik a komplementrendszer aktivációjának szabályozásában is a C3b további, iC3b-re és C3d-re való degradációjával (49).

1.2.3.2. Az mCR1/2 stimulálásának stratégiai és hatása az immunválasz alakulására

Az egyik elterjedt stratégia az mCR2 célzására több, egymást követő C3d fragmentumhoz kapcsolt antigén alkalmazása. C3d-tojás lizozim (hen egg lyozime, HEL) (42), vagy C3d-kanyaró vírus hemagglutinin fehérje (50) konjugátumokkal való immunizáció növelte az antigénspecifikus IgG szérumszinteket, ahhoz képest, hogyha az antigéneket önmagukban adták. Egy C3d-influenza hemagglutinin fehérje konstrukciót

kódoló DNS vakcina alkalmazása szintén emelte az anti-hemagglutinin neutralizáló ellenanyagok mennyiségét, illetve az ellenanyagok aviditása, és a hemagglutinációt gátló aktivitása is emelkedett (51). Ezzel szemben a C3d-diftéria toxin fúziós fehérjékkel való immunizáció hatására csökkent a diftéria toxin ellenes antitest szint (52;53), míg C3d-sztreptavidin (SA) tetramerek szuboptimális koncentrációban fokozták, nagyobb dózisban viszont gátolták a sztreptavidin specifikus IgM illetve IgG termelést. Emellett kimutatták azt is, hogy a SA-C3d konjugátumok CR1/2 hiányos egereknél is fokozták az anti-sztreptavidin ellenanyagok termelődését (53;54). Ezek az ellentmondó eredmények jelzik, hogy a C3d-antigén konjugátumok alkalmazása nem egyértelműen a leghatékonyabb módszer az mCR1/2 célzására. A CR1/2 hiányos egereknél kimutatott fokozott immunválasz utal a CR1/2-től független folyamatok jelenlétére, továbbá a konjugátumok hatását befolyásolja a komplexek koncentrációja mellett az antigén természete, illetve a C3d fragmentumok aggregációja.

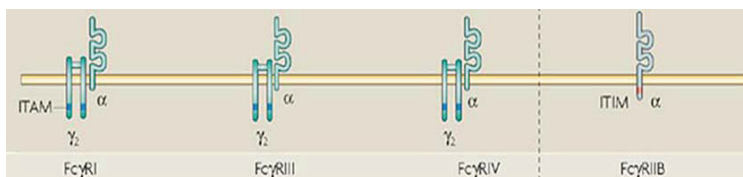
A másik elterjedt mCR1/2 stimulálási mód az irodalomban az agonista anti-CR1/2 ellenanyagok alkalmazása. A 7g6 anti-mCR1/2 ellenanyaghoz (55) kapcsolt ovalbumin (OVA) (56), vagy Alexa 488 festék (57) fokozott antigénspecifikus IgG termelést váltott ki, ahhoz képest, ha izotípus kontrol ellenanyag-antigén konjugátumot, vagy F(ab')₂-antigén konjugátumot vagy az antigént önmagában alkalmazták. Az F(ab')₂-antigén konjugátum esetén megjelenő gyenge ellenanyagválasz jelzi, hogy nemcsak az mCR1/2-nek, hanem valószínűleg az FcγR-oknak is szerepe van a kiváltott hatásban. Az FcγR-ok hatása kivédhető, ha Fc-rész nélküli rekombináns ellenanyagot alkalmaznak a célzáshoz. Prechl J. és munkacsoportja a 7g6 ellenanyagból rekombináns egyláncú ellenanyagot (scFv) hozott létre a 7G6 hibridóma sejtek RNS-éből kiindulva, az immunglobulin gének klónozásával (58). A 7g6 scFv-hez kapcsolt influenza hemagglutinin eredetű peptiddel végzett *in vitro* kísérletekben kimutatták, hogy az anti-mCR1/2 scFv hatékonyan segítette a hozzá kapcsolt peptid B-sejtek általi felvételét és bemutatását (59). Ugyanakkor az *in vivo* kísérletekben ugyanez a konjugátum nem indukált hatékony humorális immunválaszt.

Irodalmi adatok alapján tehát elmondható, hogy az antigének mCR1/2 receptorok való eljuttatása sok esetben a B-sejtek fokozott aktivációját és ellenanyagtermelés váltottak ki, ugyanakkor immunválaszt gátló hatások is megjelenhetnek. Az mCR1/2 stimulálása antigén jelenlétében a sejtek szintjén egyértelműen az aktiváció elősegítését jelenti, ám a szervezet szintjén értelmezett hatás már nem egyértelmű; az aktiváció helyett tolerancia is kialakulhat, és függ erőteljesen a célzásra használt konjugátumtól.

1.2.4. Az egér Fc γ R-ok

1.2.4.1. Az egér Fc γ R-ok szerkezete és funkciói

Az egér IgG Fc-részét kötő receptorok közé az IgG-hez nagy affinitással kapcsolódó Fc γ RI (CD64), és a kis affinitással kapcsolódó Fc γ RIIB, III és IV tartoznak (60-62) (3. ábra). Az Fc γ RI, III és IV aktiváló receptorok; a szerkezetükre jellemző, hogy a ligandum kötésért felelős lánc mellett egy közös γ - γ lánc, az Fc γ található, amely a jelátvitelért felelős, és része az Fc γ R mellett más Ig izotípusokat (pl. IgA és IgE) felismerő FcR-okban is (63).

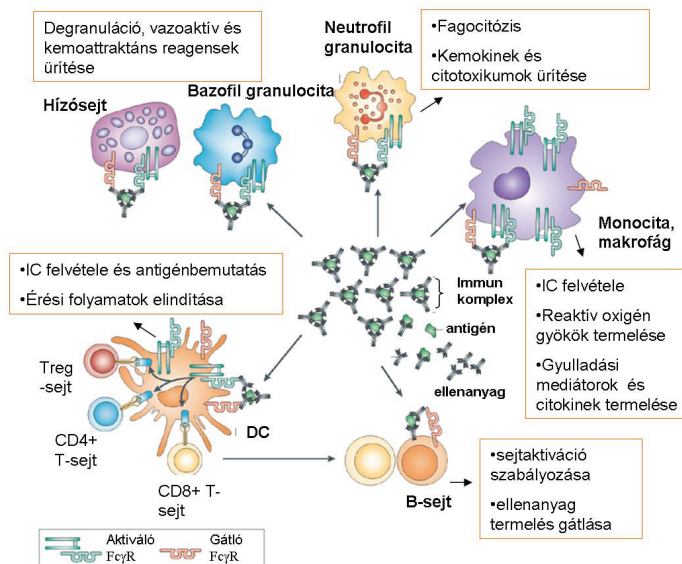


3. ábra: Az egér Fc γ R receptorok szerkezete és elnevezése. Az aktiváló Fc γ R receptorok több láncból állnak, a jelátvitelért az ITAM motívumot hordozó γ -láncok felelnek. A gátló Fc γ RIIB egy láncból áll, amelynek intracelluláris részén ITIM jelátvivő motívum található. (Kép forrása: Nimmerjahn F et al, Nature Rev Immunology, 2008)

Az Fc γ R láncok intracelluláris szakaszukon immunreceptor tirozin alapú aktivációs motívumot (ITAM) (64) hordoznak, amely foszforilálódik a receptorok keresztkötése során, olyan jelátviteli folyamatokat indítva, amely többek között az IC-ek fagocitózisához, gyulladásos citokinek termeléséhez, degranulációhoz, vagy az ellenanyag függő citotoxikus reakciókhoz vezetnek (63), valamint hozzájárulnak a DC-k érésehez is (65) (4. ábra). A természetes immunrendszer számos sejtje kifejezi az aktiváló Fc γ R receptorokat, többek között monocitákon, makrofágokon, DC-ken, neutrofil és bazofil granulocitákon, hízósejteken és természetes ölősejteken (NK sejtek) is megjelennek (61). Az Fc γ R-ok kifejeződhetnek nem immunsejteken is, mint az endotél sejtek, az oszteoklasztok, vagy a mikrogliá sejtek, ám ezek szerepe még kevésbé ismert.

Az Fc γ RIIB receptor egyetlen láncból áll, amelynek intracelluláris szakaszán gátló hatású, immunreceptor tirozin alapú inhibíciós motívum (ITIM) található (66;67), és főként a B-sejteken, a DC-ken, az FDC-ken, a makrofágokon, és a granulocitákon fejeződik ki (61). Az Fc γ RIIB keresztkötése a BCR-rel (66) vagy egy aktiváló Fc γ R-ral (68) az ITIM

motivumok foszforilációjához és a második receptor jelátvitelének blokkolásához vezet, ezáltal sejtípustól függően gátolhatja az ellenanyagtermelést, a gyulladásos citokinek termelését és a degranulációt (4. ábra).



4. ábra: Az FcγR receptorok főbb szerepei az immunfolyamatok szabályozásában. Az FcγR-ok fontos szerepe az ellenanyaggal opsonizált antigének, azaz az immunkomplexek felvétele és az antigénbemutatás elősegítése DC-ken és makrofágokon, továbbá keresztalkótűdésük kiváltja ezen sejtek érését és gyulladásos folyamatokat is elindít. Az FcγR-ok szabályozzák a B-sejtek aktivációját, és gátolják a túlzott ellenanyagtermelést. Ezen kívül szerepet játszanak a hízósejtek, a neutrofil, illetve bazofil granulociták degranulációjában, valamint a természetes öölsejtek által irányított ellenanyag függő citotoxikus reakcióban. (Kép forrása: Nimmerjahn F. et al, 2008, Nat. Rev. Immunol.)

Az FcγRIIB-nek kétféle izoformája mutatható ki: a B1 izoforma csak a B-sejteken, a B2 pedig csak a mieloid eredetű sejteken található (69). A B1 izoforma esetében leírták, hogy intracellulárisan 19 aminosavval hosszabb, mint a B2, ami megakadályozza a receptor internalizációját (70), ezáltal az antigénbemutatását, és az így induló T-sejt aktivációt is

(71;72). Ezzel szemben a B2 izoforma képes kisebb, szolubilis immunkomplexek felvételre (70;73) és segíti az antigének bemutatását.

Az Fc γ R-ok ligandumai egerekben a négyféle IgG alosztály tagjai, azaz az IgG1, IgG2a, IgG2b (esetenként IgG2c) és IgG3 ellenanyagok, amelyek mindegyike képes kapcsolódni az Fc γ R-okhoz, bár különböző affinitással, és a preferencia Fc γ R receptorokként eltérő (74;75).

I.2.4.2. Az egér Fc γ R-ok stimulálásának stratégiai és hatása az immunválasz alakulására

Az Fc γ R-ok legfontosabb szerepe az IC-k megkötése, felvétele, és az antigén bemutatásának segítése. Az Fc γ R-ok segítségével felvett immunkomplexben lévő antigének bemutatásra kerülhetnek nemcsak MHCII, hanem MHCI receptorok által is DC-ken (76;77), amely sejtek ezáltal a CD4+ T-sejtek (78;79) mellett képesek a CD8+ citotoxikus T-sejteket (80) is aktiválni. De Jong és munkatársai megvizsgálták a különböző Fc γ R-ok hozzájárulását az IC-formában felvett antigének bemutatásában. Kísérleteikben OVA-anti-OVA IgG immunkomplexeket oltottak Fc γ hiányos, Fc γ RIIB hiányos, Fc γ és Fc γ RIIB hiányos, továbbá vad típusú egerekbe, OVA-specifikus T-sejtek adoptív transzfere mellett. Az eredmények szerint Fc γ R nélkül nem történt antigénbemutatás T-sejteknek, valamint a legkevésbé az Fc γ RIV vesz részt az antigén feldolgozásában. Az Fc γ RI, II és III egyformán fontos, és redundáns szerepűnek bizonyult, azaz valamelyik kiütésével az IC-ben lévő antigén bemutatásának hatékonysága nem csökken, még akkor sem, ha csak az Fc γ RIIB működőképes. Eszerint az Fc γ RIIB nem akadályozza a DC-k antigénbemutatását és így közvetve az érést sem (65;81), annak ellenére, hogy a sejtaktivációra nézve gátló jelátviteli utakat indukál az aggregációja. A képet árnyalja, hogy Fc γ RIIB hiánya DC-ken azok spontán érésehez vezet (82), és fokozott T-sejtet aktivációt is okoz (83), a vad típusú DC-khez képest. Ezek a kísérletek jelzik, hogy a DC-kben is gátló jelátviteli folyamatokat indukál az Fc γ RIIB aktiválása, ám ennek szerepe nem az antigén feldolgozás teljes megakadályozása, hanem inkább a sejtek spontán vagy túlzott aktivációjának gátlása.

A T-sejtes immunválasz erősítése mellett az antigének Fc γ R-okhoz való irányítása mind Ig-antigén (84-86), mind anti-Fc γ R ellenanyag-antigén konjugátum formájában (87;88) fokozott humorális immunválaszhoz is vezet, holott a B-sejteken a gátló Fc γ RIIB jelen van. Heyman és munkatársai kimutatták, hogy vad típusú egerek immunizációja anti-TNP és TNP-BSA konjugátummal százszoros anti-BSA IgG ellenanyagszint emelkedést okoz, az antigén önmagában történő oltásához képest (89). Az Fc γ RIIB hiányos egereknél pedig ennél jóval magasabb anti-BSA IgG mennyiséget mértek. A kísérlet mutatja, hogy Fc γ RIIB-nek

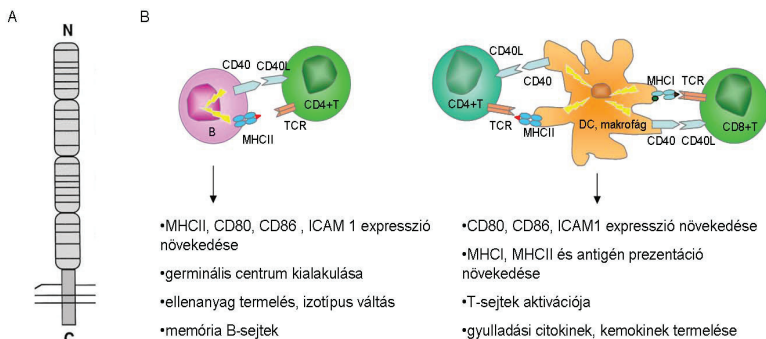
hasznó szabályozó szerepe van B-sejtek aktivációs folyamataiban, mint a DC-knél, azaz nem meggátolja az ellenanyagtermelést, hanem megfelelő szinten tartja, kivéve a túlzott, és akár károsodást is előidéző mennyiségeket. Ezt támasztja alá az az eredmény is, hogy az Fc γ RIIB hiányos egereknél a szabad, nem IC formában előforduló antigén is magasabb ellenanyagszintet okoz (68), a vad típusú egerekhez képest. Az Fc γ R-ok célzásakor tapasztalt fokozott ellenanyagtermeléshez valószínűleg nagyrészt hozzájárul az aktiváló Fc γ R-ok kereszt kötése a mieloid sejteken, amely hatására az ellenanyagtermelést elősegítő citokin környezet jöhet létre; ugyanakkor a gátló és az aktiváló Fc γ R receptorok szerepének megoszlása az IC-ek által kiváltott immunfolyamatokban továbbra sem egészen tisztázott. Egyes elgondolások szerint a fokozott humorális válasz annak köszönhető, hogy egereken megnő az FDC-ken az Fc γ R-ok expressziója immunizáció hatására (90;91), így a bemutatott IC-ekben lévő IgG-k Fc-részeinek lekötésével az FDC megakadályozza a B-sejteken a BCR kereszt kötését a gátló hatású Fc γ RIIB-vel. Másik elgondolás szerint az IC-k komplement fragmentumokat is tartalmazhatnak, így képesek a CR1/2-höz kötődni, amelyek az ellenanyagtermelésre pozitívan hatnak (92). Ugyanakkor antigén-IgG komplexszel való immunizáció Fc γ lánc hiányos, de ép komplementrendszerrel rendelkező egerekben nem idézett elő immunreakciót (89;93), ám a komplementrendszer hiányában, de működőképes Fc γ Rs jelenlétében kialakult hatékony immunválasz (92).

Összefoglalva elmondható, hogy az antigének Fc γ R-okhoz való irányítása növeli immunogénitását, ám az egyes Fc γ R-ok egyedi szerepe, vagy a komplement receptorok hozzájárulásának mértéke ebben a folyamatban nem teljesen tisztázott.

1.2.5. Az egér CD40 receptor

1.2.5.1. Az egér CD40 receptor szerkezete és funkciói

A CD40 receptor a tumor nekrozis faktor receptor szupercsalád tagja. Egyetlen, négy ciszteinben gazdag szakasz ismétlődéseit tartalmazó polipeptid láncból épül fel (94) (5. ábra A). Konstitutíven kifejeződik az összes APC-n (95), továbbá leírták jelenlétét endotél, epithel sejteken és fibroblasztokon is (96). Liganduma a CD4+ T-sejteken kifejeződő CD40L (CD154), amellyel kapcsolódva sokrétű folyamat indít az APC-kben. Egyrészt hozzájárul differenciációjukhoz, éréstükhöz: újabb kostimulációs molekulák, mint a CD80, a CD86 megjelenését, az ICAM 1 és a MHCII fokozott expresszióját (97), valamint gyulladási citokinek és kemokinek termelését idézi elő (98;99) (5. ábra B).



5. ábra: A CD40 molekula szerkezete és funkciói. (A) A CD40 fehérje egy I-es típusú transzmembrán protein, amely extracelluláris részén négy ciszteinben (a vonalak a diszulfid hidakat jelzik) gazdag doménből épül fel, amely domének a TNF receptorok sajátosságai (kép forrása: Van Kooten C. Et al. 2000, J. Leukoc. Biol.). (B) A CD40 az APC-ken fejeződik ki, liganduma a T-sejteken megjelenő CD40L. A CD40 stimulálása – antigén jelenlétében – szerepet játszik az APC-k érésében, a germinális centrum kialakításában, T- és B-sejtek aktivációjában, az ellenanyag, a citokinek és a kemokinek termelésében, továbbá memória válasz kialakulásában is.

A DC-k stimulálása CD40-en keresztül a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtekké teszi őket, egyes kutatások szerint képesek CD8+ citotoxikus T-sejteket hatékonyan aktiválni

CD4+ T-sejtek jelenléte és segítségével is (100;101). A B-sejteken, a fent felsoroltakon kívül, a CD40 receptor aktivációja elengedhetetlen a sejtek osztódásához, az ellenanyag termeléshez és izotípusváltáshoz (102;103), továbbá előfeltétele a hatékony B- és T-sejt kapcsolódásnak, és az ezáltal szabályozódó germinális centrum képződésnek (104) illetve a memória válasz kialakulásának (105) (5. ábra B).

1.2.5.2. Az egér CD40 receptor stimulálásának stratégiai és hatása az immunválasz alakulására

Az agonista anti-CD40 ellenanyagokat széles körben használják APC-k CD40 receptoron keresztüli stimulálására. Az anti-CD40 ellenanyagok alkalmazása az egyébként gyenge immunogenitású antigének, mint pl. tumor antigének, mellett, képes előidézni az antigénspecifikus citotoxikus T sejtek aktivációját (106-108). Szintén segíti az antigénspecifikus humorális immunválasz kialakulását az önmagukban kevésbé hatékony TI antigének (T-sejtektől független B-sejt aktivációt okozó) mellett, mint pl. a *Streptococcus pneumoniae* polisзахarid (109) vagy *Salmonella* eredetű antigén (110). A CD40 receptor stimulálása szinergisztikusan hatott egyéb, elsősorban a DC-ken megjelenő receptorok hatásával; kimutatták, hogy a DEC205 (111), vagy a DC immunreceptorok célzásával (112) kiváltott specifikus celluláris immunválasz további erősítése lehetséges antagonistá CD40 ellenanyag adásával, vagy ugyanígy a TLR7-en keresztül kiváltott tumorelleses immunválasz is tovább erősíthető (113).

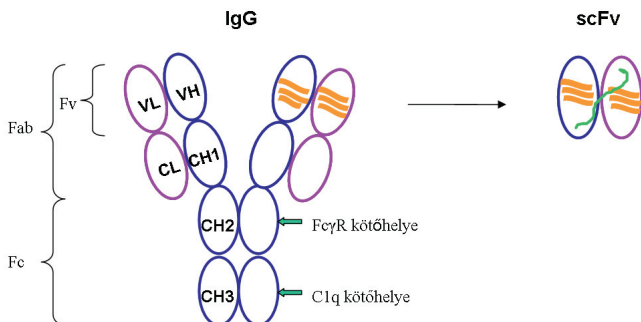
Az immunválasz fokozásához legtöbbször az agonista CD40 ellenanyagot nagy dózisban (0,3-1 mg/oltás) alkalmazták, amely esetenként szisztémás gyulladásos folyamatok (114), illetve szepikus sokk (115) kialakulásához, vagy a CD8+ T sejtek elöléséhez vezetett (116). A mellékhatások csökkentek, ha az agonista anti-CD40 ellenanyagot lokalizálták a tumor sejtekhez (117), vagy ha az antigént közvetlenül az agonista ellenanyaghoz kapcsolva juttatták el az APC-khez (118). Ez utóbbi esetben Frleta D és munkatársai kimutatták, hogy avidin-anti-CD40 ellenanyag konjugátumot kis dózisban szubkután úton bejuttatva a szervezetbe, magas másodlagos avidin-specifikus Ig termelést érhető el (119). Az antigénspecifikus ellenanyag titer szintén növekedett OVA-anti-CD40 (120), vagy influenza hemagglutinin eredetű peptid-anti-CD40 fúziós fehérjével történt immunizációt követően (121), összehasonlítva az izotípus kontrol-antigén fúziós fehérjéje, vagy az önmagában adott antigén hatásával.

Az antigének CD40 receptorhoz való irányításának immunogenitást növelő mechanizmusa még nem ismert. Egyes elgondolások szerint a CD40 receptoron át felvételre

kerülhet az antigén, amit bizonyít, hogy egy anti-CD40 scFv-hez kapcsolt riboszóma inaktiváló fehérje működőképesnek bizonyult tumor sejtmallékban (122). Ugyanakkor a CD40 receptor szerepére az antigén feldolgozás elősegítésében nincs egyértelmű bizonyíték. Feltételezik azt is, hogy a B-sejtekben a BCR és a CD40-et keresztlinkáló járulhat hozzá a fokozott ellenanyagtermeléshez (120).

1.3. A rekombináns egyláncú ellenanyagok és alkalmazásuk APC-k célzására

A rekombináns egyláncú ellenanyag fragmentumok (scFv) egy immunglobulin könnyű- (VL) és nehézláncának (VH) variábilis doménjából épülnek fel, amelyeket egy 15 aminosavas, szerin és glicin gazdag peptid szakasz kapcsol össze, elegendő flexibilitást hagyva a domének helyes fehérjeszerkezetének kialakulásához (6. ábra).



6. ábra: Egy teljes immunglobulin (IgG) és a rekombináns egyláncú ellenanyag (scFv) felépítésének sematikus ábrája. CH: nehézlánc konstans domén, VH: nehézlánc variábilis domén, VL: könnyűlánc variábilis domén, CL: könnyűlánc konstans domén, Fv: variábilis fragmentum, Fc: kristályosítható fragmentum, Fab: antigénkötő fragmentum, zölddel a linker peptid látszik, a narancssárga sávok a CDR régiók.

Az első egyláncú ellenanyag előállításáról és jellemzéséről két független kutatócsoport számolt be 1988-ban (123;124), akik kimutatták, hogy az scFv megőrzi az eredeti ellenanyag specifitását, és az antigénhez való kötődésének affinitása is hasonló az eredeti, teljes ellenanyagéhoz. Az irodalomban leírt scFv-kben leginkább a VL-linkerpeptid-VH orientáció a leggyakoribb, amelyről bizonyították, hogy az antigénhez nagyobb kötődési képességgel

bír (125), illetve nagyobb mennyiségben termelődik *Escherichia coli* (*E.coli*) baktériumban és stabilabb is (126;127), mint a VH-linkerpeptid-VL összetételű scFv-k. Merk és munkatársai azonban igazolták, hogy megfelelő termelési körülmények között a VH-linkerpeptid-VL felépítésű scFv is működőképes és kompetál az eredeti ellenanyaggal, akárcsak az ellentétes orientációjú (128).

Az scFv-k számos előnyös tulajdonsággal bírnak a teljes ellenanyagokkal szemben, amelyek miatt előszeretettel és egyre szélesebb körben alkalmazzák őket célzott terápiás (radioimmunterápia), vagy in vivo képző eljárásokban (129;130). Egyik fő előnyös tulajdonságuk, hogy az eredeti specificitás megőrzése mellett az Fc-rész hiányában nem indukálnak a szervezetbe juttatva a specificitásuktól független, az Fc-receptorokhoz való kötődés vagy a komplementrendszer aktivációja által indított, toxikus illetve gyulladási folyamatokat, amelyek hosszabb távon károsíthatnák a szervezetet. Mivel rekombinációs fehérje, a létrehozása után könnyen és költséghatékonyan módosítható, egyszerű fúzionáltatni antigénnel, toxinnal vagy gyógyszerhatóanyagokkal. Emellett kisebb mérete révén mélyebbre juthat a tumoros szövetekben, és gyorsabban is ürül ki, mint a teljes ellenanyag, amely előnyös, ha toxikus anyag van hozzákapsolva. Hátránya egy teljes ellenanyaggal szemben, hogy monovalens: az említett két variábilis domén határozza meg az egyetlen antigénkötő helyét, így receptorok keresztkötésére, és ezáltal sejtek aktiválására, nem képes. Ugyanakkor tumorterápiás területen éppen a monovalenciája és az ebből is eredő gyors penetrációja, valamint hatékony infiltrációja miatt terjedt el az alkalmazása. Radioimmunterápiás eljárásokban sztreptavidinnal konjugált és tumorantigénekre specifikus scFv-kel tumor sejteket jelölnek, majd második lépésben radioaktív izotóppal konjugált biotint juttatnak a szervezetbe (131;132). A biotin-sztreptavidin nagy affinitású kapcsolódásnak köszönhetően a toxin a tumorsejtekhez kerül, elpusztítva azt, míg az scFv-k gyors kiürülése miatt a szervezet egyéb része nem sérül. Monovalens scFv-k alkalmazását leírták egyes anyagok vér-agy gáton való átvittetésében (anti-transzferrin scFv-t alkalmaztak) (133), továbbá immunsejteknek tumorsejtekhez (134) illetve patogénekhez (135) való lokalizációjában is, ahol az összekapcsolás elősegítette az immunsejtek tumor, vagy patogén ellenes aktivációját, és így a célsejtek pusztulását.

A receptorok keresztkötésére és a sejtek aktivációjának kiváltására is alkalmassá lehet tenni az scFv-ket multimerizáció segítségével, és így az aviditásuk is emelkedik. Az egyik jól ismert útja az scFv multimerizációjának a linker peptid hosszának csökkentése 5-0 aminosavra, amikor bivalens dimer (diabody, (129), trivalens trimers (triabody, (125;136), és tetraavalens tetramerek (tetraabody, (137;138) is kialakulhatnak önmaguktól, a megfelelő szerkezet keresése közben. Ezen kívül leucin zipzársz motívumok, vagy amfifil hélix-kötés

általi di- vagy tetramerizáció (139;140), diszulfid hídral (141), vagy scFv-khez fűzionált p53 domén segítségével történő (142;143) oligomerizáció is ismert. Továbbá leírták az scFv-knek az Ig konstans domének (144-146), vagy az Ig Fc-részének fűziójával történő oligomerizációját is (147). Ez utóbbi változtatások már jelentősen kihatnak az scFv-k penetrációs és infiltrációs tulajdonságára, így egy teljesen új, a minibody elnevezést kapták. Végül a sztreptavidin-biotin nagy affinitású kapcsolódása is alkalmazható az scFv-k oligomerizációjára, amikor az scFv-khez vagy genetikai úton kapcsolták a sztreptavidint (148), vagy biotinilált scFv-ket konjugálnak sztreptavidinnel (149). Ez utóbbi esetben enzimatis úton biotinilálni kellett az scFv-t, amelyet a BirA biotin ligáz enzim biotin-kapcsoló doménjének az scFv szekvenciájához való építésével oldottak meg.

Az scFv-k bizonyítottan képesek az antigének hatékony irányítására *in vitro* és *in vivo* kísérleti körülmények között is. Anti-CR1 scFv-hez fűzionált influenza hemagglutinin peptidet LPS jelenlétében oltva, az anti-hemagglutinin IgG ellenanyag szintek szignifikáns növekedését tapasztalták (150). Szintén fokozott antigénspecifikus humorális és celluláris immunválasz megjelenését tapasztalták a DEC205 receptorra specifikus scFv-vel fűzionált *Mycobacterium tuberculosis* eredetű antigént immunizációjánál, a csak antigénnel történt oltáshoz képest (151). Az anti-DEC205 scFv hatékonyan bizonyult az antigének - pl. egyes tumor eredetű peptid, DNS vagy glikolipidek - célreceptorhoz való irányítására sztreptavidin-biotin konjugátum formájában is: SA-scFv fűziós fehérjét konjugálták a biotinilált antigénnel, majd a kapott konjugátumokkal egereket immunizálva kimutatták, hogy mindegyik típusú antigén, anti-CD40 ellenanyag adása mellett, erőteljes specifikus Ig termelést vált ki, és a T sejtek interferon γ szekrécióját is növeli (127). Az scFv-k általi irányítás hatásosságát jelzi, hogy segítségével akár adjuváns nélkül is növelhető fehérje természetű antigén immunogenitása, a célreceptortól függően: hFc γ RI-et kifejező transzgén egerek anti-Fc γ RI scFv-sztreptavidin fűziós fehérjével való immunizációja magas anti-sztreptavidin IgG szintet, és Th1, illetve Th2 citokinek megjelenését eredményezte adjuváns nélkül is, szemben a csak sztreptavidinnel történt oltással (87).

Az scFv-k azonban nem minden esetben bizonyulnak hatékonyan a hozzájuk kapcsolt antigén immunogenitásának növelésében. Munkacsoportunk korábban végzett kísérleteket influenza hemagglutinin eredetű peptidnek a CR1/2 receptorokhoz való irányításával, ahol az anti-CR1/2 7g6 ellenanyagból előállított scFv-t használták a célbajuttatásra (58). *In vitro* körülmények között a 7g6 scFv elősegítette a hozzákapcsolt antigén B-sejtek általi felvételét és bemutatását az antigénre specifikus T sejteknek (59), viszont *in vivo* kísérletekben nem bizonyult hatékonyan az antigénspecifikus ellenanyagválasz kiváltásában, csupán IgM izotípusú specifikus ellenanyagok jelentek meg (152). Elgondolásunk szerint a 7g6 scFv-vel

CR1/2 receptorokhoz való antigén irányítás hatékonysága növelhető lenne, ha az antigént egyidejűleg más receptorokhoz, pl. Fc γ R, is irányítanánk, vagy ha adjuváns anyagokat, pl. mikrogöngyöket, is beépítenénk a célzó komplexekbe.

I.4. Mikrogöngyök alkalmazása adjuvánsként

Mint azt korábban említettem, a nano- és mikrogöngyök adjuváns hatása egyrészt a méretükből adódik, ugyanis a vírus ($\leq 0,5 \mu\text{m}$) méretű részecskéket a DC-k, míg a bakteriális ($\geq 0,5 \mu\text{m}$) méretű partikulumokat a F4/80+ makrofágok hatékonyan fagocitálják (14;17), így a hozzájuk kapcsolt antigének is könnyebben kerülnek felvételre az APC-k által. A szolubilis kismolekulák, antigének és immunkomplexek sejtes közvetítés nélkül, főként a nyirokáramlással illetve a nyirokcsomó vezetékain képesek eljutni egészen a B-sejtes zónáig (153;154). A virális mérettartományba eső partikulumok közül a 20-200 nm átmérőjű részecskék szintén szabadon áthatolnak a nyirokkeringésbe (16), majd onnan a nyirokcsomók szubkapszuláris szinuszába, ahol a szubkapszuláris szinus makrofágok és B-sejtek által közvetítve (43;155) érik el a nyirokcsomók B-sejtes zónáját és az FDC-ket. Az ennél nagyobb méretű részecskék viszont csak a már említett sejtközvetített módon kerülnek be a nyirokcsomókba (18). A felvett nano- és mikrogöngyök elindítják a DC-k és a makrofágok érését, a kostimulátor molekulák fokozott expresszióját (CD40, CD86, MHCI és MHCII) és citokinek termelését, továbbá segítik az antigének bemutatását is (156). A méret mellett a mikropartikulumokon az antigének ismétlődése - amely szintén jellemzője a patogén felszíneknek - is elősegíti az APC-k általi gyors felismerést (157). Kimutatták, hogy 15-20 epitóp, amely 5-10 nm-enként követi egymást a legoptimálisabb elrendezés a hatékony B-sejt aktiváció eléréséhez (158). Ennek hátterében az áll, hogy az ismétlődő epitópok ideális kötődési pontok a természetes IgM ellenanyagoknak, ezáltal a komplementrendszer is jobban aktiválják, mint a monomer antigének.

Az antigének nano- és mikropartikulumokhoz való kapcsolása irodalmi adatok alapján egyértelműen növeli az antigénspecifikus T-sejtes immunválaszt. Fokozott patogén elleni citotoxikus T-sejtes aktivációt tapasztaltak többek között HIV-1 p24 fehérjével kapcsolt nanogöngyök hatására (159), vagy nanogöngyökre adszorbeált *Mycobacterium tuberculosis* antigének oltásánál (160), valamint *Plasmodium berghei* eredetű, illetve influenza A vírusból származtatott szintetikus peptideket tartalmazó, polimer politejsav/glikolsav mikrogöngyökkel immunizált állatokban (161). Ez utóbbi kísérletben kimutatták azt is, hogy az 500 nm-nél kisebb göngyökkel alkotott komplexeknél a citotoxikus T-sejtes reakció erősebb volt, mint a 2 μm átmérőjűeknél. A nano- vagy

mikrogyöngyök hatékonyabbnak bizonyultak az alumínium sókat, vagy QuilA-t, vagy a monofoszforil lipid A-t tartalmazó, szintén humán felhasználásra tervezett adjuvánsoknál a celluláris immunválasz indukálásban (17).

A nano- és mikropartikulumok alkalmazása az antigének jelenlétében emeli az antigén-specifikus ellenanyag szinteket is: OVA-mikrogyöngy komplexszel való immunizáció során magas OVA-specifikus IgG1 szintet mutattak ki (17;156). A partikuláris elemek jól kombinálhatóak egyéb adjuvánsokkal, mint pl. a CpG. Ha CpG oligonukleotidokat hordozó zselatin alapú nanopartikulumokat alkalmaztak adjuvánsként OVA mellett (162), vagy akár *Streptococcus* B antigént kapcsoltak CpG-t tartalmazó mikrogyöngyökhöz (163), megnövekedett antigén elleni IgG termelést, illetve CD8⁺ T-sejt számot mutattak ki, összehasonlítva szabad CpG és antigén, vagy partikulum és nem konjugált antigén, illetve a csak antigén oltás hatásával. Az irodalmi adatok alapján tehát a nano- vagy mikropartikulumok jelenléte az oltóanyagban egyértelműen adjuváns hatású.

II. Célkitűzések

Kutatócsoportunk régebb óta foglalkozik az egyláncú ellenanyagok jellemzésével és lehetséges felhasználásukkal az immunválasz irányításában, módosításában, azon előnyös tulajdonságuk miatt, hogy az általuk kiváltott hatás csak az adott célreceptorhoz köthető. Korábbi kísérletek során az antigének CR1/2 receptorokhoz való irányítása nem bizonyult elég hatékonynak *in vivo* körülmények között a kapcsolt antigén immunogenitásának növelésében. Elgondolásunk szerint, ha a modell antigént nem, vagy nemcsak, a CR1/2 receptorhoz, hanem egyéb, az APC-k aktivációját befolyásoló receptorhoz - úgymint a FcγRII/III vagy a CD40 - irányítjuk egyidejűleg, az antigénspecifikus immunválasz fokozható. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy hogyan módosul az immunválasz, ha az említett receptorok kombinációit célozzuk. Emellett meg akartuk vizsgálni azt is, hogy az scFv-k által irányított antigének immunogenitása tovább növelhető-e mikrogöngyök alkalmazásával.

A munkánk során tehát célunk volt:

- A CD40 specifikus FGK rekombináns egyláncú ellenanyag előállítása és specifikitásának igazolása
- Sztreptavidin alapú moduláris célzó komplexek kialakítása, amelyek képesek a modell antigént az egyláncú ellenanyagok segítségével az antigénprezentáló sejtekhez, elsősorban a B-sejtekhez és a makrofágokhoz, irányítani
- 510 nm átmérőjű, sztrepavidinnel fedett mikrogöngy alapú célzó komplexek jellemzése az összeszerelődés, a célsejtekhez való kötődés (B-sejtek és makrofágok), és az *in vivo* lokalizáció szempontjából
- *In vivo* kísérletekben a humorális immunválasz alakítása, befolyásolása modell antigéneknek a
 - a, komplement receptor 1 és 2, illetve a kis affinitású FcγRII és III receptorokhoz
 - b, CD40, illetve a kis affinitású FcγRII és III receptorokhozvaló irányításával.

III. Anyagok és módszerek

III.1. Anyagok

2% SLS oldat: 2 w/v% SLS (Fluka), 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (Sigma), MilliQ víz (Millipore)

5x nem redukáló PAGE minta puffer: 313 mM Tris-HCl, 50 v/v% glicerin, 5 w/v% SDS (Reanal), 0,02 w/v% brómfenolkék (Reanal), MilliQ vízben

10x-es Tris-glicin puffer: 0,25 M Tris-HCl, 1,92 M glicin (Reanal), MilliQ víz

10x TBE puffer (1 l): Tris-HCl (60.50 g), bórsav (30.85g) (Reanal), Na₂EDTA x 2H₂O (3.72g) (Reanal), MilliQ víz

12%-os szeparáló gél (10 ml): 2,31 ml 30 w/v% N,N-bisz-akrilamid (Biorad), 1,37 ml MilliQ víz, 1,25 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 µl 10 w/v% SDS, 50µl 10 w/v % APS (Sigma), 5µl TEMED (Fluka)

4%-os gyűjtő gél (10 ml): 1,32 ml 30w/v% N,N-bisz-akrilamid, 6,03 ml MilliQ víz, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8, 100 µl 10 w/v% SDS, 50 µl 10 w/v% APS, 10 µl TEMED

ACK: 155 mM NH₄Cl (Reanal), 10 mM KHCO₃ (Reanal), 130 µM EDTA, MilliQ

AEC oldat (1 lemezre): 10 mg AEC (Sigma), 1 ml dimetilformamidban (Sigma) oldva, majd 30 ml 0,1 M Na-acetát puffer, szűrés után 15 µl H₂O₂ (Sigma)

Ca/Mg Veronal puffer: 2.5mM Ca²⁺, 0.7mM Mg²⁺, 0.05% Tween 20, 5%BSA

EDTA-veronál puffer: 25mM EDTA, 5%BSA, 0.05% Tween 20

Ekvilibrált Shephadex A50 anioncserélő gyanta (1 l): karbamid (Reanal) (72 g), 50 mM Tris HCl pH 8,0, Sephadex QAE-A50 (200 ml) (Pharmacia), MilliQ víz

Eluáló puffer affinitás kromatográfiához: 250 mM imidazol, 5 % glicerol, 20 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ (Reanal), 50 mM Tris-HCl pH 8,0

FACS puffer: 0,1 v/v% FCS (Gibco), 3 v/v% Na-azid (Fluka), PBS-ben

GKN (1 l): 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 1,77 g Na₂HPO₄x2 H₂O, 0,69 g Na₂HPO₄x H₂O (Reanal), 2 g glükóz (Reanal), 10 mg fenolvörös (Sigma), MilliQ víz

0,1 M Karbonát puffer, pH 8,5: 0,1 M NaHCO₃ (Reanal), 0,001 M NaCO₃ (Reanal), MilliQ

Lízis puffer: 50 mM HEPES (pH 7,4), 100 mM NaF, 10 mM EDTA, 1% TritonX-100 (Sigma), 10 mM glicerol, 10 mM Na-pirofoszfát (Sigma), 10 mM β-glicerofoszfát (Sigma), 10 µg/ml aprotinin (Sigma), 5 µg/ml leupeptin (Sigma), 0,2 mM PMSF (fenil-metil-szulfonfluorid, Sigma)

Mosó puffer affinitás kromatográfiához: 10 mM imidazol (Sigma), 1% glicerol (Reanal), 300 mM NaCl (Reanal), 50 mM Tris-HCl pH 8,0

PBS-puffer: NaCl (8 g/l), KCl (0.2 g/l, Reanal), Na₂HPO₄x2 H₂O (1.424 g/l, Reanal), NaH₂PO₄x2 H₂O (2,866 g/l, Reanal), KH₂PO₄ (0,2 g/l, Reanal), MilliQ víz

PBS-Tween: PBS-ben 0,05 v/v% Tween20 (polioxietilén-szorbitán-monolaurát, Sigma)

STE oldat: 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 (Sigma), 2 mM EDTA (Reanal), MilliQ vízben

SDS-PAGE futtató puffer (1 l): 100 ml 10x-es Tris-glicin-puffer, 10 ml 10w/v%-os SDS, MilliQ víz

TAE puffer 50x (1 l): 242 g Tris, 57,1 ml ecetsav (96%), 100ml 0,5 M EDTA, MQ vízben

TMB oldat: 0,1 mg/ml 3,3,5,5-tetrametil-benzidin (TMB, Sigma), 0,018v/v% H₂O₂, 0.1 M Na-acetát pufferben

Renaturáló pufferek Ni affinitás kromatográfiához:

	I	II	III	IV	V
1 M Tris-HCl pH 8,0	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
3 M NaCl	0,8 ml	1,6 ml	2,4 ml	3,2 ml	4,0 ml
6 M karbamid	40 ml	32 ml	24 ml	16 ml	8 ml
MilliQ víz	4,7 ml	11,9 ml	16,6 ml	26,3 ml	33,5 ml

A PCR reakciókhoz használt primerek és a CpG oligonukleotid szekvenciája:

név	5' szekvencia	3'	gyártó
VkBackNco	tccatggacattgagctcaccagctcc		Isogen Bioscience
ratCk	ccagttaactgttccg		Isogen Bioscience
VH5Combi	aggtgcagctgswggagtc		Isogen Bioscience
gCH3	ggatagacagatggggctgttg		Isogen Bioscience
LB10	ataccatggayattgwgctsaaccaatc		Sigma
LF FGK	ccagagccgccgccgctaccaccaccacagtttcaattccagcttggtccc		IDT Inc.
HB10	agcggcggcgcgcgctctggaggaggagatcagaggtgcagstggtggartc		Sigma
HFRat	tctgcggccgcggaggagacgggtgacctgac		Sigma
pET5	taatacgactcactatagg		Sigma
pET3	ctagttattgctcagcgg		Sigma
CpG 1668	tccatgacgttctctgatgct		Sigma

A Myc-HH peptid szekvenciája: biotin-SSSAAAEQKLISEEDLNHHHHHHH (Sigma)

Munkánk során használt reagensek és ellenanyagok:

elnevezés	specifititás	eredet (klón)	izotípus	gyártó
7g6 scFv	Egér CR1/CR2	Rekombináns	nincs	ELTE, Immun. Tanszék
2.4g2 scFv	Egér CD16/ CD32	Rekombináns	nincs	ELTE, Immun. Tanszék
FGK scFv	Egér CD40	Rekombináns	nincs	ELTE, Immun. Tanszék
Sztreptavidin Alexa 488 /Alexa 647	biotin	<i>Streptomyces avidinii</i>	nincs	Invitrogen
Sztreptavidinnel fedett, 510 nm Dragon Greennel jelölt mikrogyöngy (msSA)	biotin	szintetikus	nincs	Bangs Lab.
Sztreptavidin-HRP	biotin	<i>Streptomyces avidinii</i>	nincs	Sigma
9B11	c-myc-tag	egér	IgG2a	Cell Signaling
9E10	c-myc-tag	egér	IgG1	ELTE, Immun. Tanszék
Anti-egér IgG1-Alexa 488	egér IgG1	kecske	IgG	Molecular Probes, Invitrogen
Anti-egér IgG2a-Cy5	Egér IgG2a	kecske	IgG	Southern Biotech.
HRP konjugált α -egér IgG1/IgG2a	egér IgG1/G2a	kecske	IgG	Southern Biotech.
Anti-egér CD40	egér CD40	patkány (FGK45.5)	IgG2a	ELTE, Immun. Tanszék
Anti-egér C3-HRP	C3	kecske	IgG	Cappel
Anti- C3-Alexa 647	C3	kecske	IgG	Cappel

Munkánk során használt reagensek és ellenanyagok, folytatás:

elnevezés	specifititás	eredet (klón)	izotípus	gyártó
Anti-egér CD32	egér CD32	egér (K9.361)	IgG2a	ELTE, Immun tanszék
Anti-egér CD40-APC	egér CD40	patkány (1C10)	IgG2a	eBioscience
Anti egér CD45R (B220)-PerCP/Cy5.5	egér CD45R	patkány (RA3-6B2)	IgG2a, kappa	eBioscience
Anti-egér CD11b-Alexa 647	egér CD11b	patkány (M1/70)	IgG2b	eBioscience
Anti-egér MHCII-PE	egér MHCII	patkány (M5/117)	IgG2b, kappa	BD Bioscience
Anti-egér CD3-Alexa 647	Egér CD3	Patkány (KT3)	IgG2a	AbD Serotec
Gr-1-PE	Egér Ly-6G	Patkány (RB6-8C5)	IgG2b	ELTE, Immun. Tanszék
Anti-egér κ/λ lánc	egér Ig κ/λ lánc	kecske	IgG	Southern Biotech.

Egyes ellenanyagokat a tanszéken tisztítottunk hibridóma felülüzőkből, ezeknél a gyártóknál az ELTE Immun. Tanszék van feltüntetve.

III.2. Módszerek

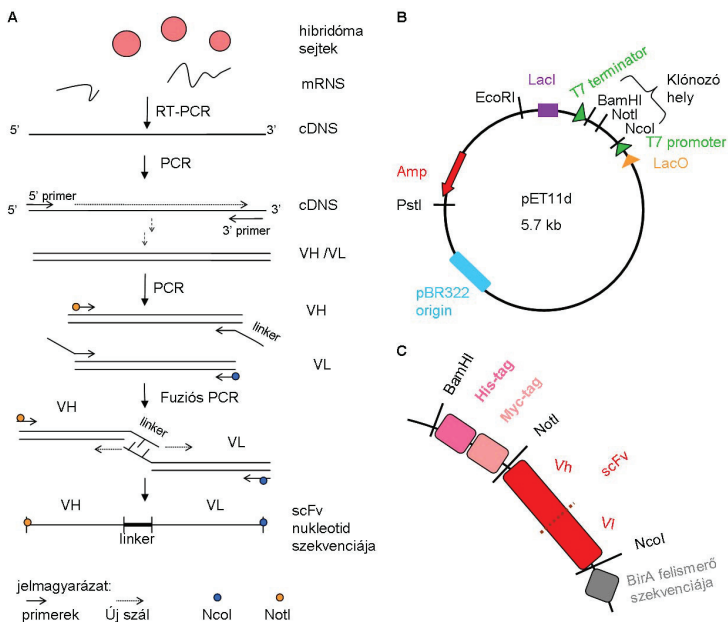
III.2.1. Az FGK egyláncú ellenanyag előállítás

III.2.1.1 Az immunoglobulin könnyű- és nehézláncának klónozása

Az FGK scFv előállításához rendelkezésünkre állt az eredeti, anti-CD40 monoklonális ellenanyagot termelő FGK45.5 sejtvonal (164). A hibridóma sejtekből totál RNS-t izoláltunk RNeasy Protect Mini Kit-tel (Qiagen), a kit instrukciói szerint. A kapott RNS tisztaságát és mennyiségét Nanodrop segítségével mértük meg, és 100-200 ng-jából reverz transzkripcióval cDNS-t készítettünk, RevertAid M-MuLV reverz transzkriptáz (Fermentas) és oligo dT (Fermentas) segítségével, a Fermentas protokollja alapján. Az immunoglobulin gének nehéz-

és könnyűláncának variábilis régióit (VH és VL) a megfelelő – egyik a variábilis domén belüli vázszekvenciákra, a másik a konstans Ig domének nukleotid szekvenciájának egy szakaszára illeszkedő - primerpárok segítségével szaporítottuk fel első körben (6. ábra A). Ezek a primerek a VL esetében a VkBackNco (5' primer) és a ratCk (3' primer), a VH esetében pedig a VH5Combi (5' primer) és a gCH3 (3' primer) voltak. Ezután az így kapott PCR termékből tovább sokszoroztuk a VH és a VL szakaszokat, belsőbb helyzetű, közvetlenül a variábilis doménekhez kapcsolódó primerpárokkal: a VL esetében az LB 10 és az LF FGK, a VH esetében a HB10 illetve a HFrat pár bizonyult alkalmasnak. A felszaporított variábilis régió méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

A következő lépésben a VH és VL szekvenciák összeillesztésével létrehoztuk az scFv szekvenciáját. Ehhez nagyobb mennyiségben állítottuk elő mindkét variábilis régiót PCR segítségével, tisztítottuk MinElute PCR purification kittel (Qiagen), majd fúziós PCR reakció során összekapcsoltuk. A fúziót az tette lehetővé, hogy a könnyűlánc variábilis szakaszához kapcsolódó 3' primerek (LF FGK) és a nehézlánc variábilis szakaszához illeszkedő 5' primerek (HB10) egymással komplementer szakaszt tartalmaztak, amelyek a kezdeti fúziós PCR lépésekben (első 5 ciklus) összekapcsolódva a polimerizáció indulási helyét biztosították, azaz így a VL vagy a VH mellé megsztetizáltattuk a másik variábilis régiót. A további lépéseknél pedig a már összekapcsolt VL+VH szakasz szaporítása történt. A komplementer régió kódolja a VL-t és VH-t összekötő linker szakaszt, amely biztosítja a két domén flexibilitását az antigén kötődésénél. A fúziós PCR termékét a reakció után alacsony olvadáspontú agaróz gélből izoláltuk és tisztítottuk MinElute Gel Extraction kittel (Qiagen), majd NcoI (Fermentas) és NotI (Fermentas) restrikciós enzimekkel emésztettük. Az NcoI hasítóhelyet az LB10, a NotI hasítóhelyét a HFrat primerrel építettük az scFv szekvenciájába. Az emésztett és tisztított fúziós PCR terméket egy azonos enzimekkel emésztett és szintén kitisztított, linearizált pET 11d vektorba építettük be (6. B. ábra) T4 DNS ligáz (Fermentas) segítségével, a gyártó protokollja alapján. A ligálásnál a plazmidhoz az scFv szekvenciáját tízszeres moláris feleslegben adtuk, majd szobahőmérsékleten, 2 órán át inkubáltuk. Ezt követően 100 µl kompetens *E.coli* TOP10 klónozó baktériumot (Stratagene) transzformáltunk a ligálási elegy 3 µl-ével: a baktériumokat tartalmazó szuszpenziót és a plazmidot 15 ml-es Greiner csőbe mértük, 30 percen keresztül jégen tartottuk, majd 42°C-os vízfürdőbe helyeztük 40 másodpercre. Ezután a mintákhoz 1 ml LB médiumot (Sigma) adtunk, egy órán át 37°C-on ráztuk, majd 3500 rpm-es 5 perces centrifugálás után kientük 100 µg/ml ampicillin (Fluka) tartalmú 1,5 w/v%-os agar (Sigma) táptalajra. A táptalaj készítéséhez előzőleg 100 ml LB



6. ábra: Az scFv DNS szintű előállítás. (A) Hibridóma sejtekből klónoztuk a VL és a VH szekvenciákat, majd fúziós PCR-rel összekapcsoltuk őket. A létrehozott scFv szekvenciáját NcoI és a NotI endonukleázok hasítottuk (az ábrán a színes körök a beépített hasítóhelyeiket jelzik), és az ugyanígy emésztett (B) pET11d vektorba illesztettük. A pET11d vektor klónozásra és fehérje termelésre egyaránt alkalmas, ampicillin rezisztenciát hordozó plazmid. (C) Az általunk használt pET11d vektor klónozó helyét korábban úgy módosítottuk, hogy az NcoI és NotI enzimek segítségével beépülő scFv szekvenciája a BirA biotin ligáz enzim felismerő helye, valamint a Myc- illetve His-tagek szekvenciája közé került.

médiumba 1,5 g agart tettünk, felolvasztottuk, majd lehülés során hozzáadtunk 100 µl, 100 mg/ml-es ampicillint, és Petri csészékbe öntöttük. A gélen egy éjszakás, 37°C-os növesztés után megjelent, transzformált baktérium telepek közül az scFv-t tartalmazókat PCR segítségével - az LB10 és HFRat primereket használva -, és restrikciós enzimekkel adott egyedi hasítási mintázatok alapján választottuk ki. Végso megerősítésként a pozitívnak

bizonyult klónokat szekvenáltattuk, kimutatva, hogy tartalmazzák az FGK scFv szekvenciáját. A szekvenálásokat a Biomi Kft (Gödöllő) végezte.

Az scFv szekvenciát egy olyan módosított pET11d vektorba építettük, amely tartalmazza a Myc-tag és a Hexahisztidin-tag (His-tag) szekvenciáját a beépítés helyétől 3' vég felé, továbbá a BirA biotin ligáz enzim felismerő helyét az 5' vég felé (6. B és C ábra). Tehát a tagek a klónozó helyen kódolt fehérjének a C-terminálisához kapcsolódnak, míg az N-terminális enzimatikusan biotinilálható lett. A His-tagnek az scFv-k tisztításában, a Myc-tagnek pedig az azonosításukban van szerepe.

Az FGK45.5 ellenanyag klónozásával előállított scFv megjelölése a dolgozatban FGK scFv.

III.2.1.2. A polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR reakciókat az ABI (Applied Biosystem) 2720 Thermal Cycler géppel végeztük, a következő összetételű reakcióeleggyel: steril MilliQ víz, 2 mM MgCl₂ (Fermentas), 0,2 mM dNTP (Pharmacia), 0,5-0,5 µM a primerekből, 5x Taq puffer (Fermentas), 0,5-1 u / 20 µl Taq (Fermentas) és 0,2 µl cDNS vagy 200-300 ng/µl koncentrációjú plazmid. A baktérium telepek szűrésénél DNS templákként maga a telep szolgált, amelyet steril fogpiszkálóval mártottunk a PCR reakcióelegybe. Az scFv vagy aVH/VL felszaporításához a következő PCR hőprofil alkalmaztuk: 94°C-5 perc és 55°C - 2 perc, majd 30 cikluson keresztül 72°C - 40 sec., 94°C - 40 sec. és 55°C - 40 sec., végül a záró polimerizációs lépés 72°C-on 7 percig tartott, majd a mintákat 4°C-on tartottuk a felhasználásig.

A fúziós PCR hőprofilja a következő volt: 94°C - 1 perc és 55°C - 1 perc, 72°C - 1perc, minez 5 cikluson keresztül, majd 94°C - 50 sec., 55°C - 50 sec., 72°C - 50 sec. 25 cikluson át, és végül a záró polimerizációs lépés: 72°C - 7 perc. Az első 5 ciklusban a reakció primerek nélkül ment, ekkor a VL és aVH a komplementer szakaszokon keresztül hibridizálódott, majd az LB10 és a HFrat primerek hozzáadása után további 25 cikluson át a teljes scFv szekvenciájának szaporítása történt.

III.2.1.3. DNS elektroforézis agaróz gélben

Munkánk során a PCR termékek és plazmidok minőségét, és méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Az 1,5 w/v%-os agaróz gél készítéséhez 1,5 g agarózt (SERVA) mértünk 100 ml TBE pufferhez, mikrohullámú sütőben melegítettük az elegyet az agaróz felolvadásáig, majd a géltartó tábla öntve (fésű beállítása után) megvártuk, míg kihűl

és megszilárdul. A futtatás 100V-on történt, 0,5 µg/ml végkoncentrációjú etídium-bromid (Sigma) tartalmú TBE-pufferben; az etídium-bromid a DNS-t teszi láthatóvá UV fényben. Mintapufferként hatszoros hígítású, 0,25 w/v% OrangeG festék és 30 v/v% glicerol tartalmú elegyet alkalmaztunk. A DNS méretét házi gyártású létrával – amely a pBI-C3 plazmid PstI és HindIII enzimekkel emésztett fragmentumaiból állt –, vagy GeneRuler 100bp DNS létra (Fermentas) segítségével határoztuk meg. Az alacsony olvadáspontú agaróz (NuSieve GTG agaróz, Cambrex) gélelektroforézishez a gél- és a tankuffer is TAE oldat volt, a futtatás pedig 50V-on történt, minden más megegyezett a fentiekkel.

III.2.1.4. Restrikciós endonuklázzal való emésztés

A fúziós PCR termék pET11d vektorba való beépítéséhez mindkét DNS terméket emésztettünk NcoI és NotI enzimekkel, a Fermentas cégnek a két enzimre javasolt kettős emésztési protokolla alapján. A reakció elegybe alkalikus foszfatáz (Promega) enzimet is adtunk, amely defoszforilációval eltünteti az 5' végi foszfát csoportokat a linearizált plazmid végekről, megakadályozva a vektor visszazáródását. Az emésztési reakció 50 µl végtérfogatban, három órán át, 37°C-on zajlott, majd a defoszforilálást és az emésztést az elegy 65°C-on való, 15 perces hőinaktiválásával állítottuk le. Emésztés után az scFv szekvenciáját az enzimektől és a kisebb DNS fragmentektól MinElute PCR Purification Kittel (Qiagen) tisztítottuk, míg a linearizált plazmidot a nem linearizált formától 0,8 v/w%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélelektroforézissel választottuk el, ezután pedig a linearizált plazmid csíkját kivágtuk és tisztítottuk MinElute Gel Extraction kittel (Qiagen). Miután a tisztított és emésztett plazmidok és az scFv is rendelkezésünkre állt, ligáltuk őket.

A pozitív telepek szűrésénél a telepekből mini plazmid preparációt készítettünk, majd azt emésztettük a megfelelő enzimekkel a Fermentas cég protokollja alapján. A kapott fragmentumok méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

III.2.2. Az FGK scFv termelésének ellenőrzése dot blottal

Az emésztések és a PCR reakciók alapján pozitív, azaz az FGK scFv szekvenciáját tartalmazó baktériumtelepeknél ellenőriztük, képesek-e az scFv-ket előállítani fehérje formájában. Ehhez a telepekből mini plazmid preparációt készítettünk EZ-10 Plazmid DNA kittel (Bio Basic Inc.) a leírás alapján, a plazmidokat pedig *E.coli* BL21 (Stratagen) expressziós törzsbe transzformáltuk a már leírt módon. A kinőtt telepekből mini tenyészeteket indítottunk, párhuzamosokkal, egy 96 lyukű U-aljú sejtenyésztő lemezen (Corning), úgy

hogy a steril fogpiszkálóval egyenként felszedett telepeket a lemez lyukaiba mért 200 µl, 100 µg/ml ampicillin tartalmú Overnight Express Autoinduction System (Novagen) médiumba érintettünk; a maradékot továbboltottuk ampicillines 1,5 v/w% agar (Sigma) lemezre (master plate). A tenyészeteket egy éjszakás, 25°C-on rázatva történő növesztést követően lefugáltuk 3500 rpm-mel, 5 percig, majd a felülúszót leöntöttük. A felvortexelt sejtekhez 100 µl lizis puffert adtunk, majd fél óráig jégen való inkubációt követően lefugáltuk őket 5 perc 3500 rpm-mel. A felülúszóból mintánként 2-2 µl-t nitrocellulóz membránra (Bio-Rad) pipettáztunk, majd hagytuk megszáradni. Az előhívásnál beáztattuk a membránt PBS-Tween oldatba, azután blokkoltuk a felszínét 5 v/w% BSA (Sigma) tartalmú PBS-Tween-nel. Minden mosásnál és hígításnál PBS-Tween-t alkalmaztunk, a jelölések és mosások szobahőmérsékleten, lengőasztalon történtek. Blokkolás után háromszor 10 percig mostuk a membránt, majd egy órán át kezeltük 100x hígítású, 9E10 anti-myc-tag felülúszóval. Újabb 3x10 perces mosás után, 4000x-re hígított kecske anti-egér IgG1-HRP ellenanyaggal inkubáltuk a membránt egy órán át. Az utolsó, hatszor 5 perces mosást követően a mintákat előhívtuk ECL reagenssel (Enhanced Chemiluminescent, Pierce) a protokollnak megfelelően, és a kemilumineszcenciás jeleket Forte röntgenfilmmel detektáltuk.

III.2.3. Az scFv termelése és tisztítása

Az scFv-t tartalmazó plazmidot kompetens *E.coli* BL21 expressziós baktérium törzsbe transzformáltuk, és a baktériumokat 2 ml 100 µg/ml végkoncentrációjú ampicillines LB oldatban növesztettük egy éjszakán át. Másnap a tenyészetet továbboltottuk 300 ml ampicillines LB médiumba, és $OD_{600}=0,7-0,8$ eléréséig növesztettük a sejteket. Ezután 1 mM izopropanol-β-D-tiogalaktopiranozid (IPTG, Fermentas) hozzáadásával indukáltuk a fehérjetermelést, és további 3-4 órán át 37°C-on ráztuk a tenyészetet. A zárványtestekben expresszált protein tisztítását Kurucz és mtsai. módosított útmutatója alapján végeztük (58;165). Röviden összefoglalva, a bakteriális sejteket előbb lizozimmal (SERVA) kezeltük, majd 0,1 w/v% SDC (Reanal) detergens mellett ultrahangos roncsolással feltártuk, végül a zárványtesteket 2w/v%-os SLS (Fluka) tartalmú pufferben feloldottuk. Ezt követően 10 mM CuSO₄ hozzáadásával, szobahőmérsékleten kevertettük egy éjszakán át az oldatot, hogy oxidáció során kialakuljanak az Ig domén szerkezetre jellemző láncon belüli diszulfid hidak. Ezután az SLS-t kivontuk az oldatból 6 M urea-50 mM Tris-HCl-el ekvibrált SephadexQAE A50 (Pharmacia) ioncserélő gyanta többszöri hozzáadásával, mivel a következő kromatográfiás lépésnél az oszloptöltetet károsítja. A 6M ureában lévő fehérjét ekvibrált

Ni-NTA (Sigma) oszlopon folyattuk át, kihasználva, hogy a Ni^{2+} kelát komplexet képez a His-taggal, és emiatt az scFv-k kikötődnek az oszlopon. A fehérje renaturálását, azaz a natív konformációjának elnyerését az urea koncentrációját fokozatosan csökkentő (6-0 M), egyidejűleg a NaCl-arányt növelő (0-300 mM) oldatsorozattal tettük lehetővé. Az oszlopról ezután mosó pufferrel lemostuk az aspecifikusan kötődő fehérjéket, majd a renaturált fehérjét is lemostuk eluáló oldattal.

III.2.4. Az FGK scFv illetve az scFv tartalmú célzó komplexek jellemzése *in vitro* és *in vivo*

III.2.4.1. Sejtvonalak és egerek kezelése

Munkánk során a következő sejtvonalakat használtuk: A20 egér B-limfóma sejtek (American tissue cell culturing azaz ATCC száma TIB-208) és a P388D1 egér makrofág sejtvonal (ATCC szám: TIB-63). Tenyésztésüket 37°C -on, 5%-os CO_2 szint mellett nedves termosztátban, valamint 5% vagy 10% FCS (GIBCO), 2 mM L-glutamin (Sigma), 100U/ml penicillin (Sigma), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sztreptomycin (Sigma), 50 μM 2-merkaptotanol és 1 mM nátrium-piruvát (Sigma) tartalmú RPMI 1640 (GIBCO) médiumban tartva végeztük. Az egerekből izolált primer sejtek tárolásához, mosásához szintén ilyen összetételű médiumokat használtunk.

Az *in vivo* kísérleteknél 6 hetes nőstény BALB/c egereket (Charles Rivers Lab.) immunizáltunk. Az állatok tartása és kezelése az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével (iktatószám: 221/828/003/2007), a hatályos szabályok betartásával történt.

III.2.4.2. Csontvelői eredetű dendritikus sejtek (BMDC) differenciálata, illetve nyirokcsomó és lép eredetű sejtuszpenziók készítése

BALB/c egerek combcsontjának epifizist levágtuk, a csontvelőt átmostuk 3 ml GKN oldattal, egy 25G-s injekciós tű (Medicor) és fecskendő (Sologard) segítségével. Ezután a sejtuszpenziót lefugáltuk 1200 rpm-mel, 8 percig, és a felülülő leöntése majd a sejtvellet fellazítása után a vörösvértesteket lizáltuk 1 ml ACK oldat hozzáadásával. 1 perc elteltével GKN oldattal újra mostuk a sejteket az ACK oldat eltávolítása miatt, azután felvettük őket 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban. A sejtuszpenziót szűrtük 0,7 μm -es szűrőn (BD Bioscience), és megszámoltuk Countess (Invitrogen) automata sejtszámlálással, 0,4% tripánkéék festékkel (Invitrogen) elkülönítve az elpusztultakat. Ezután 10^6 sejtet 5% egér GM-

CSF felüliszó (a termelő klón X63 GM-CSF) jelenlétében 7 napig tenyésztettünk, úgy, hogy a GM-CSF-et kétnaponta visszapótoltuk. A 7. napon a sejtek egy részét 50 nM CpG 1668 oligonukleotiddal aktiváltuk, és további egy napon át tenyésztettük őket, majd felhasználtuk az FGK scFv kötődésének jellemzésére áramlási citofluoriméteres vizsgálatokban.

A nyirokcsomó eredetű sejtek izolálásához a nyirokcsomókat GKN oldatban szétdörzsöltük, mostuk kétszer 8 perces 1200 rpm-es fugalással, majd 5% FCS és 2-merkaptotanol tartalmú RPMI 1640 médiumban vettük fel. A szuszpenziót átszűrjük 0,7µm-es sejtszűrőn, majd megszámloltuk Countess (Invitrogen) automata sejtszámlálóval. A lépesejtszuszpenzió készítésénél az előbbiekhöz hasonló módon jártunk el, kiegészítve azzal, hogy a GKN-nel való mosás után lizáltuk a vörösvértesteket 1 ml ACK oldattal a BMDC-k izolálásánál már ismertetett módon.

III.2.4.3. Áramlási citofluorimetria

Az scFv-k és komplexeik kötődését sejtvonalakhoz, vagy primer sejtekhez áramlási citofluoriméter segítségével vizsgáltuk. Az áramlási citofluorimetriás mérésnél mintánként 3×10^5 sejtet FACS csövekbe osztottunk szét, majd mostuk őket 1 ml FACS pufferben, 8 perces 1200 rpm centrifugalással. A jelölések közötti mosást ugyanígy végeztük. A sejtek fellazítása után 20 percig, jégen tartva jelöltük őket fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyagokkal vagy reagensekkel, akár több lépésben. Az utolsó jelölési lépés után mostuk a sejteket, majd 150 µl FACS-pufferben felvettük őket. A mérést FACS Calibur citofluoriméterrel (Beckton Dickinson) végeztük, az adatok kiértékeléséhez FCSEXPRESS szoftvert alkalmaztunk. Az áramlási citofluoriméteres mérések során a teljes ellenanyaggal való jelölése esetén használtunk FcR blokkoló K9.361 ellenanyagot is, 20 µg/ml végkoncentrációban, amelyekkel a teljes ellenanyagok bemérése előtt 5 percig kezeltük a sejteket. Az egyes kísérleteknél a jelölési lépéseket az alábbiakban ismertetjük.

Az FGK scFv különböző sejttípusokhoz való kötődésének kimutatásához a sejteket először mintánként 1-1,5 µg scFv jelenlétében inkubáltuk, majd mosás után 200x hígított SA-Alexa 488-at adtunk hozzájuk. A különböző sejtpopulációk elkülönítésére szolgáló fluoreszcens ellenanyagokat 0,5-1 µg/ml végkoncentrációban alkalmaztuk, és a B-sejteket anti-CD45R-PerCP/cy5.5 (B220), a T-sejteket anti-CD3-Alexa647, a makrofágokat anti-CD11b-Alexa 647, a granulocitákat Gr-1-PE ellenanyaggal jelöltük, míg a BMDC-k közül az éretteket magas anti-MHCII-PE jelölődésük alapján azonosítottuk.

Az FGK45.5 teljes ellenanyag és az FGK scFv közötti kompetíciós kísérletnél az első jelölési lépésnél előbb hozzáadtuk a mintákhoz a 100x vagy 5x hígítású teljes ellenanyagot vagy az izotípus kontrollt, majd 5 perc elteltével az 1,3 µg scFv-ket. 20 perc inkubációt és egy mosást követően a SA-Alexa 488 hozzáadásával detektáltuk az scFv-k kötődését.

A tetramer scFv-k kötődésének jellemzéséhez 1 µg scFv-t előre konjugáltunk 0,5 µg SA-Alexa 488 reagenssel fél órán át szobahőmérsékleten, majd a konjugátumokkal jelöltük a sejteket. A SA-scFv és msSA-scFv komplexek kötődésének citofluorimetriás mérésénél is a fentiek szerint jártunk el, azaz az scFv-ket SA-Alexa 488-reagenssel, vagy Dragon Green fluoreszcens festékkel töltött mikrogönggyökkel konjugáltuk 2:1 tömegarányban, egy órán át szobahőmérsékleten, majd nyirokcsomó eredetű sejtszuszpenzióhoz adtuk, amelyben a B-sejteket anti-CD45R-PerCP/cy5.5 (B220), a makrofágokat anti-CD11b-Alexa 647 ellenanyagokkal jelöltük.

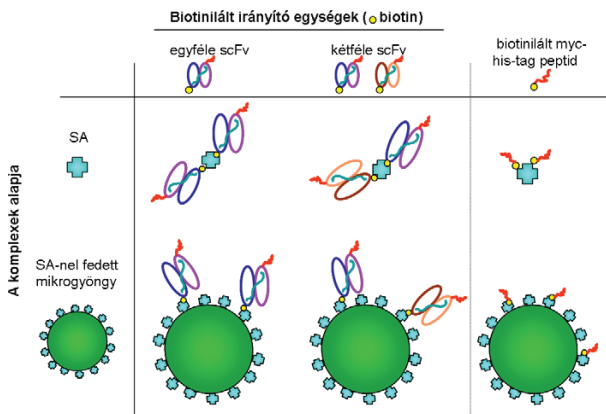
III.2.4.4. Az scFv-k biotinilálása és sztreptavidinnel való konjugálása

Az enzimatisz monobiotinilálást az scFv szekvenciájához kapcsolt BirA enzim felismerőhelye tette lehetővé (149), amelyhez az enzim egy biotint képes kapcsolni. Az affinitás kromatográfia után az eluáló pufferben lévő, tisztított scFv-ket BirA kittel (Avidity) monobiotiniláltuk a kit protokollja alapján. A reakció egy éjszakán keresztül, szobahőmérsékleten zajlott, majd a nem kötődött biotint a monobiotinilált scFv-ktől gélszűrőssel különítettük el egy 0,1 M karbonát pH=8 pufferrel ekvilibrált, 8 cm magas Sephadex G50 medium (Pharmacia) oszlop használatával. Ezáltal a szeparálással egyidejűleg puffercserét is végrehajtottunk: az scFv-k karbonát pufferbe kerültek, amelyet a végkoncentrációt tekintve 5 v/v% glicerollal (Reanal) és 250 mM imidazollal (Fermentas) egészítettünk ki, hogy az scFv hónapokig stabil és felhasználható legyen.

A célzó komplexek kialakításához a szolubilis sztreptavidinhez (Fluka), vagy a sztreptavidinnel fedett mikrogönggyökhöz (msSA, Dragon Greennel jelölt mikrogönggy, Bangs Lab.) kevertük a monobiotinilált scFv-ket SA:scFv 1:2, azaz telítő tömegarányban (7. ábra). A msSA komplexeknél a mikrogönggyök kalkulált SA tartalma alapján számoltunk, amely a gyártó leírása alapján 20,5 µg SA/ mg mikrogönggy, amely 10mg/ml-es gönggyoldatban 0,2 µg SA/µl mikrogönggy. A konjugálás PBS-ben történt szobahőmérsékleten, állandó kevertetés mellett, egy órán át. A mikrogönggyöket a konjugációt megelőzően kétszer mostuk PBS-sel, 8 perc 10.000 rpm fugalással, majd ultrahangos vízfürdőben 2-3 percig szonikáltuk, hogy homogén szuszpenziót hozzunk létre. A

konjugációt követően egy mosási lépéssel az scFv-k feleslegét is eltávolítottuk a msSA-scFv komplexek mellől.

Az *in vivo* kísérletek során kontroll komplexként a szintetikus és biotinilált myc-his-tag peptidet (myc-HH) hordozó SA-myc-HH illetve msSA-myc-HH konjugátumokat használtuk, amelyeknél 4:1 moláris arányban kevertük a peptidet a SA-hez.



7. ábra: A célzó komplexek összetétele. Egy vagy kétféle biotinilált scFv-t konjugáltunk szolubilis SA-val vagy SA-val fedett mikrogöngyökkel (msSA-val). Kísérleteinkben kontroll komplexként a csak az antigént tartalmazó, szintetikus és biotinilált myc-HH-tag peptidet hordozó SA/msSA konjugátumokat alkalmaztunk.

III.2.4.5. Az SDS poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az scFv-k tisztaságának ellenőrzésére SDS-PAGE-t végeztünk (Bio-Rad készülék), 12%-os szeparáló és 4%-os gyűjtőgél használva. A mintákat 5x nem redukáló mintapufferben, és 100V-120V feszültség mellett, 0,1% SDS tartalmú Tris-glicin oldatban futtattuk. Az elválasztott fehérjéket 5 w/v%-os Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük (Reanal) lengőasztalon, egy órás 25°C-on történő inkubáció alatt. Ezután 10%-os metanol (Reanal) és 40%-os ecetsav (Reanal) tartalmú differenciáló oldattal (többször cserélve) a háttérfestődést lecsökkentve, láthatóvá tettük a fehérje csíkokat. A fehérje méretét PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas) fehérje létra segítségével ellenőriztük.

A SA-scFv komplexek SDS-PAGE módszerrel való kimutatásához 5 µg SA-t és 2,5 µg scFv-t (SA:scFv 2:1 tömegarány) konjugáltunk PBS-ben, majd 10%-os szeparálógélen, 5x nem redukáló pufferben, a minták előzetes forralása nélkül futtattuk, és Coomassie festékkel festettük meg. A két külön receptorhoz irányító SA-scFv komplexek kimutatásához fluoreszcens festékkel jelzett 7g6 scFv-t illetve 2.4g2 scFv-t konjugáltunk SA-Alexa647 reagenssel. A 7g6 scFv Alexa488 fluoreszcens festékkel való jelölésekor 0,9 mg/ml koncentrációjú, 0,1M karbonát pH8 pufferben lévő scFv-hez adtunk 7 µl, 10 mg/ml-es reaktív festéket (Alexa 488-szukcinimid észter, Molecular Probes, Invitrogen), kevertettük szobahőmérsékleten egy órán át, majd a reakciót egy tized térfogatnyi 1 M Tris-HCl hozzáadásával leállítottuk. A nem kötődött festéket egy 11 cm magas, 0,1 M karbonát pufferrel ekvibrált Sephadex G-25 medium (Pharmacia) oszlopon, géliszűréssel választottuk el. A 7g6-A488 és a 2.4g2 scFv-ket úgy konjugáltuk SA-Alexa 647-tel, hogy minden komplex azonos mennyiségű adott scFv-t hordozott: az egyféle scFv tartalmú komplexnél a tömegarány 4 µg SA: 2µg scFv, míg a kétféle scFv-t tartalmazó komplexeknél 4 µg SA : 2-2 µg scFv volt. A különböző összetételű komplexeket egy órán át szobahőmérsékleten konjugáltuk, majd futattuk 10%-os SDS-PAGE gélen, 5x nem redukáló mintapufferben és sötétben. Végül a gélft buborék- és gyűrődésmentesen fóliába csomagoltuk, és a fluoreszcens jeleket Typhoon Trio+ szkennelrel mértük.

III.2.4.6. Az egerek immunizálása

Az in vivo kísérleteknél csoportonként 8-8 BALB/c egeret oltottunk szubkután, talpba és faroktőbe, egerenként 5 µg SA és 10 µg scFv tartalmú oltóanyaggal, inkomplett Freund adjuváns (Sigma) jelenlétében. Az egyes oltási csoportokban a 7g6, a 2.4g2 vagy az FGK scFv-knek, és kettős kombinációiknak a szolubilis sztreptavidinnel (SA) vagy a sztreptavidinnel fedett 510 nm-es mikrogöngyökkel (msSA) alkotott komplexeivel immunizáltunk; a komplexek összetételét a 7. ábra mutatja. Az oltásokat megismételtük a 14. napon. Az egereket a 28. napon feláldoztuk, szérumot gyűjtöttünk tőlük és izoláltuk az oltás helyéhez legközelebb eső, azaz a térdhajlati és a lágyéki nyirokcsomókat.

Az immunizációs protokoll beállításánál végzett kísérletekben 4-4 BALB/c egeret oltottunk intraperitoneálisan, adjuváns nélkül, vagy szubkután inkomplett Freund adjuvánssal együtt, 10 napos egyszeri oltást vagy 28 napos oltási protokollt követve. Ez utóbbinál a 0. napi oltást egy 14. napi ráoltás követte. Az antigén dózis 5 µg SA és 10 µg scFv volt egerenként és oltásonként. A kontroll csoportba csak SA-val vagy msSA-val oltott egerek tartoztak,

mivel a myc-HH tag peptid még nem állt rendelkezésre, így az anti-SA IgG ellenanyagszintek változásával jellemeztük az immunizáció sikerességét. Az egyszeri immunizáció nem volt elegendő az antigénspecifikus ellenanyagválasz kialakításához, így csak a 28. napos oltás adatait mutatjuk be a dolgozatban.

III.2.4.7. Fluoreszcens és konfokális mikroszkópia

A Dragon Green fluoreszcens festékkel töltött mikrogyöngyök P388 makrofágokhoz való kötődésének vizsgálatához a gyöngyöket kétszer mostuk PBS-sel, 8 perc 10000rpm-es centrifugálással, majd vízfürdőben szonikáltuk 3 percig. 10^3 P388 sejtet mértünk ki FACS-csővenként, mostuk FACS pufferral 8 perces 1200rpm centrifugálással, majd a következő anyagokat adtuk hozzájuk csővenként: 1 μ g SA tartalmú mikrogyöngy, 125x hígított Draq5 (Biostatus) és 25x hígítású koleratoxin B-Alexa 566 (Molecular Probes, Invitrogen). A mintákat jégen, vagy 37°C-on inkubáltuk egy órán át, majd mostuk és tárgylemezre cseppentve vizsgáltuk Olympus FV500 konfokális mikroszkóppal.

A mikrogyöngyök szubkután oltás utáni lokalizációjának meghatározásához az immunizáció után egy héttel kivettük az oltás helyéhez legközelebb eső nyirokcsomókat, és lefagyasztottuk beágyazó médiumban (Killik, Bio-Optika). A fagyasztott mintából 10 μ m vastagságú szeleteket metszettünk, tárgylemezre tettük őket, és 15 percig fixáltuk 4%-os paraformaldehiddel (Sigma), szobahőmérsékleten. Ezt követően a paraformaldehidet kimostuk PBS-sel, majd blokkoltuk a szeleteket 5 v/w% BSA tartalmú PBS-sel, szobahőmérsékleten, fél órán át. Eztután a metszeteket inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten 1-5 μ g/ml patkány anti-egér MARCO (klón: IBL-12, Dr. Balogh Pétertől származik, Kvell K, Balogh P, 2006, biophys res commun), vagy patkány anti-egér LyVE-1 ellenanyaggal (klón 223322 R&D System), amelyeket háromszori mosás után nyúl anti-patkány IgG-Cy3 (Dr. Balogh Pétertől származik) ellenanyag hozzáadásával jelöltünk. Emellett a sejtek láthatóvá tételéhez egyes mintákat 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) sejtmagfestékkel is festettünk. Minden festési lépés egy órán át, szobahőmérsékleten és nedves kamrában történt, és az ellenanyagokat PBS-ben hígítottuk. A festések után újból mostuk a sejteket háromszor öt percig PBS-sel, majd 50% glicerol tartalmú PBS-t cseppentettünk rájuk és lefedtük fedőlemezzel. A fluoreszcens jeleket Olympus BX61 mikroszkóppal detektáltuk és ImageJ szoftverrel értékeltük.

III.2.4.8. Komplement aktiváció mérése a mikrogyöngyökön

Az 510 nm-es mikrogyöngyöket, illetve pozitív kontrollként A20 B-sejtvonalat kezeltünk 5x hígított normál egér szérummal Ca/Mg veronal pufferben, illetve 5x hígított EDTA-s egér szérummal EDTA-s veronal pufferben, valamint csak magával a Ca/Mg veronal pufferrel egy órán át, 37°C-on. Ezután a mintákat mostuk háromszor PBS-sel 8 perces 1200 rpm-es centrifugálással, és elfeleztük őket. Az egyikfelét 3000x hígítású anti-mC3-HRP ellenanyaggal 45 percet inkubáltuk 37°C-on, 50 µl végtérfogatban, majd háromszori PBS-sel történő mosás után 100 µl TMB előhívó oldatot adtunk a mintákhoz, és 1 perc után leállítottuk a színreakciót 100 µl 2N kénsav (Reanal) bemérésével. A mintákat ezután lefugáltuk 8 percig 1200 rpm-mel, és a felülúszókat átmértük ELISA lemezre, majd a színreakciót ELISA Reader segítségével olvastuk le (Sanofi Pasteur, PR2100). A minták másik felét FACS pufferrel mostuk, majd jelöltük 200x hígítású anti-C3-A647 ellenanyaggal, és áramlási citofluoriméteren vizsgáltuk a C3 fehérje jelenlétét az A20 sejtek illetve a mikrogyöngyök felszínén.

III.2.4.9. ELISA

Az immunizált egerek szérumában a SA és a myc-HH-tag peptid specifikus ellenanyagtartalom meghatározásához a 96-mélyedésű ELISA lemezeket (Millipore) fedtük PBS-ben hígított 4 µg/ml koncentrációjú SA-nel. A lemezeket ezután egy éjén át 4°C-on inkubáltuk, majd másnap háromszor mostuk PBS-sel és a mélyedésekbe PBS-ben hígított 2 µg/ml koncentrációjú biotinizált myc-HH peptidet mértünk. További két óráig, 37°C-os inkubáció után háromszor mostuk a lemezeket PBS-Tween oldattal, és blokkoltuk 3 w/v%-os BSA tartalmú PBS-Tween oldattal, egy órán át 37°C-on. A következőkben minden mosáshoz és hígításhoz PBS-Tween oldatot használtunk, és minden inkubáció 37°C-on történt. A következő lépésben, háromszori mosás után, a szérumok 100x hígításból induló felező vagy ötödölő sorait mértük a lemezre, majd újabb 1,5 órás inkubációt és négyzeri mosást követően 5000x hígítású kecske anti-egér IgG1-HRP, vagy 10.000x hígítású kecske anti-egér IgG2a-HRP ellenanyagokat adtunk a mintákhoz. Ezután 45 percig inkubáltuk a lemezeket, majd négyzer mostuk, és előhívtuk TMB oldattal. A reakciót 2N H₂SO₄ hozzáadásával állítottuk le, és 450 nm-en mértük a kialakult színreakciót (referencia hullámhossz: 620nm) ELISA Reader-rel. A lemezek összehasonlításához és a relatív koncentrációk méréséhez sztenderdként a myc-tag specifikus 9E10 (IgG1) vagy 9B11 (IgG2a) monoklonális

ellenanyagokat alkalmaztuk, olyan hígításokkal, amelyeknél az egérszérumok értékei a sztenderdek a titrálási görbéjének lineáris szakaszára estek.

A monobiotinilált scFv-k sztreptavidinnel fedett mikrogyöngyökkel való konjugációjának követéséhez az ELISA lemezeket fedtük 5 µg/ml 9E10 anti-myc-tag ellenanyaggal, és blokkoltuk 3 w/v%-os BSA tartalmú PBS-Tween oldattal. Eppendorfban hígítási sorokat készítettünk scFv és 510 nm-es mikrogyöngyökkel: vagy az scFv-ket adtuk felező hígításban 50 µl 100x hígítású 510 nm-es mikrogyöngy mellett, vagy a mikrogyöngyök felező hígításait mértük 0,5 µg scFv tartalmú oldatba. A hígításokat egy órán át szobahőmérsékleten, rázatva inkubáltuk, majd lefugáltuk 8 perc 10.000 rpm-mel, és a felülúszókat a 9E10 ellenanyaggal fedett ELISA lemezre mértük. A kikötődött scFv-ket 1000x hígítású SA-HRP reagenssel detektáltuk.

III.2.4.10. ELISPOT

Az antigénspecifikus ellenanyagtermelő sejtek számát ELISPOT módszerrel határoztuk meg az *in vivo* kísérletekben. A 7g6/2.4g2 oltási sorozatnál az ELISPOT lemezeket (Millipore), steril PBS-sel való egyszeri mosás után sterilen, az ELISA módszerrel már leírt módon fedtük az SA és a biotinilált myc-HH peptid antigénnel. Ezt követően a lemezeket háromszori steril PBS-sel mostuk, és 10%-os FCS tartalmú RPMI 1640 oldattal blokkoltuk fél órán át, 37°C-on. Blokkolás után azonos oltási csoporthoz tartozó térdhajlati és a lágyéki nyirokcsomókból készített kevert sejtszuszpenzióból 10^5 sejtet mértünk lyukanként, 200 µl végtérfogóban. Ezután a lemezeket 20 órán át inkubáltuk 37°C-on, CO₂ termosztátban, majd mostuk négyszer az aljukat és négyszer a tetejüket PBS-Tween oldattal. A mosások után PBS-Tween oldatban 5000x-re hígított kecske anti-egér IgG1-HRP ellenanyagot mértünk a lemezekre (100µl/lyuk), egy órán át 37°C-on tartottuk, majd alaposan mostuk. Az előhívás AEC oldattal történt, a reakciót vizes mosással állítottuk le. A lemezeket szárítás után szkenneltük (CTL Immunoscan), és értékeltük az Immunospot 3.2 szoftverrel.

Az FGK/2.4g2 oltásoknál az össz-antigénspecifikus ellenanyagtermelő sejtek számát mértük. Az előzőekhez képest az eltérés az volt, hogy az ELISPOT lemezeket kecske anti-egér κ/λ specifikus ellenanyag 2,5-2,5 µg/ml koncentrációjú, PBS-ben készült hígításával fedtünk, továbbá hogy egerenként határoztuk meg az ellenanyagtermelő sejtek számát. A detektáláshoz biotinilált myc-HH peptiddel konjugált SA-HRP-t alkalmaztunk 1000x hígításban, a konjugálásnál a SA:myc-HH moláris aránya 1:2 volt.

III.2.4.11. Reverz fehérje mikroarray

Az immunizált állatok szérumait tárgylemezre (Roth) ragasztott nitrocellulóz membránra nyomtattuk (Bio-Rad) BioOdyssey Calligrapher (Bio-Rad) géppel, tömény, illetve 5x-ös és 25x-ös hígításban, három párhuzamossal. Kontrollként különböző hígításban PBS, 9E10, 9B11 és biotinilált kecske ellenanyag is került a membránra. Nyomtatás után a membránt 4x5 percig mostuk szűrt PBS-sel, majd 5 v/v%-os BSA PBS-Tween oldattal blokkoltuk fél órán át, lengőasztalon és szobahőmérsékleten. Ezt az oldatot alkalmaztuk minden mosásánál és hígításnál. Blokkolást követően a membránt 4000x-es hígítású SA-Alexa 647-hez konjugált myc-HH-peptiddel (molárisan 1:2 arányban konjugáltuk őket), vagy 5000x kecske anti-egér IgG1-Alexa 488 (Molecular probes, Invitrogen), vagy 4000x kecske anti-egér IgG2a-Cy5 (Southern Biotech.) ellenanyaggal kezeltük egy órán át, szobahőmérsékleten, billegtetve. Egy gyors és egy 3x10 perces mosás után szárítottuk a lemezeket, szkenneltük őket (Axon GenePix 4300A), és a kapott fluoreszcens jeleket GenPix Pro 6.0 programmal kiértékeltek.

Mivel a magyar nyelvben még nem alakult ki általánosan elfogadott, egyértelmű fordítása a mikroarray elnevezésnek, ezért a dolgozatban ezt az angol eredetű megjelölést használtuk.

III.2.4.12. Statisztikai elemzések

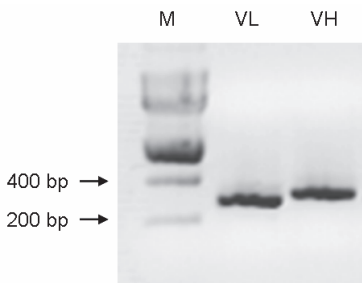
In vivo kísérletekben a kontroll és az irányított antigéneket tartalmazó komplexek által kiváltott ellenanyagtermelés vagy ellenanyagtermelő sejtek száma közötti szignifikáns különbségek kimutatására nemparaméteres, többváltozós, Kruskal-Wallis varianciaanalízist alkalmaztunk (Kruskal-Wallis ANOVA) a 7g6/2.4g2 scFv-t tartalmazó komplexekkel történt oltásoknál, és az oltási protokoll beállításánál. Nemparaméteres analízisre az *in vivo* adatok normál elosztástól eltérő eloszlása miatt volt szükség. Az FGK/2.4g2 scFv-t tartalmazó komplexekkel való immunizáció hatását az ellenanyagtermelő sejtek számára, illetve az ellenanyagtermelésre, páros permutációs teszttel elemeztük, 5000 ismétléssel. Az ELISPOT adatok statisztikai elemzését a 7g6/2.4g2 komplexekkel való oltásnál χ^2 teszttel végeztük, mivel ebben az esetben az egy csoportba tartozó egyedek sejteinek egyenlő arányú keverékével dolgoztunk, nem az egyedi értékekkel. A számításokat a Statistica 8 szoftver vagy Microsoft Excel szoftver segítségével végeztük. A szignifikáns eltérések jelzései a dolgozatban a következők: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

IV. Eredmények

IV.1. Az anti-egér CD40 rekombináns egyláncú ellenanyag létrehozása

IV.1.1. Az FGK45.5 immunglobulin könnyű- és nehézlánc variábilis doménjeinek a klónozása

Rendelkezésünkre állt az FGK45.5 agonista CD40 ellenanyagot termelő egér hibridóma sejtvonal, amelyből totál RNS izolálása és cDNS-re való átírása után, polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporítottuk az immunglobulin gének variábilis régióit. A VL domén nukleotid szekvenciáját az LB10 és LF-FGK, míg a VH doménjét a HB10 és HFRat primerpárokkal felszaporítva a kapott PCR termékek mérete 300 illetve 350 bázispár körül volt, amely megfelelt az átlagosan 110 aminosavas immunglobulin domén méretének (8. ábra).



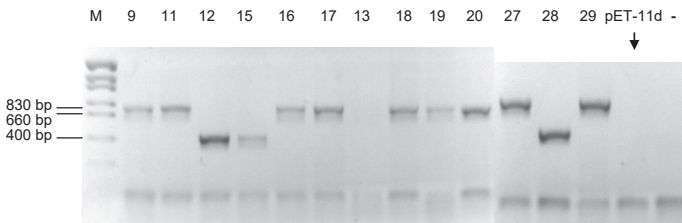
8. ábra.: Az FGK scFv előállításához az FGK45.5 hibridóma sejtek mRNS-éből cDNS-t készítettünk, majd a megfelelő primerpárokkal felszaporítottuk az immunglobulin gén könnyű (VL) és nehézlánc (VH) variábilis doménjét PCR reakció során. A termékeket 1,5 w/v% agaróz gélelektroforézissel megfuttatva a megfelelő termék VL esetében körülbelül 300 bp, a VH esetében pedig közel 350 bp méretűnek mutatkozott. M: DNS létra, frgmentált pBI-C3

Az egyláncú ellenanyag szekvenciájának létrehozásához a VL és a VH szekvenciákat ezután fúziós PCR segítségével összekapcsoltuk. A fúziós PCR termék mérete kb. 700 bázispár hosszú, amely megfelel a VH és VL, valamint a két variábilis domént összekötő 15 aminosavas linker szakasz méretei összegének (9. ábra). Az általunk használt egyláncú ellenanyagok felépítése az irodalom alapján általánosan alkalmazott formát követi, 5' végén a

VL (ez a fehérje N terminális vége), a 3' végén pedig a VH domén helyezkedik el (a fehérje C terminális vége). Az egyláncú ellenanyag szekvenciáját módosított pET11d vektorba illesztettük, és a plazmidokkal TOP10 klonozó baktériumtörzset transzformáltunk. A beépítés az NcoI és NotI enzimek segítségével történt, és mivel a két enzim hasítóhelye eltér, a beépülő szekvencia orientációját külön nem kellett ellenőrizni.

IV.1.2. Az egyláncú ellenanyag DNS szintű meglétének igazolása

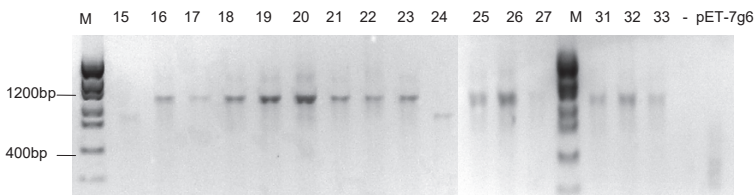
A ligálás után a kinőtt telepeket ellenőriztük, hogy tartalmazzák-e az FGK scFv szekvenciáját. Ehhez egyrészt PCR-rel szűrtük a telepeket a LB10 és a HFRat primerekkel, amelyek az egyláncú ellenanyag szekvenciáját szaporítják fel, így azok a klónok, amelyekbe beépülhetett az FGK scFv, 700 bázispár nagyságú terméket adtak (9. ábra). Negatív kontrollként az inszert nélküli, linearizált pET11d vektort használtuk.



9. ábra: Az FGK scFv szekvenciáját tartalmazó baktériumklónokat PCR-rel mutattuk ki, az scFv szekvenciájához kapcsolódó primerpár segítségével. A termékeket 1,5 w/v% agaróz gélelektorforézissel vizsgálva az scFv szekvenciáját hordozó pozitív klónok esetében 700bp méretű terméket kaptunk. A minták felett a klónok száma látható, - : DNS templát mentes kontroll minta, M=DNS létra (fragmentált pBI-C3 plazmid)

Mivel a plazmidot a ligáláshoz a 7g6 scFv-t tartalmazó pET11d emésztésével, azaz a 7g6 scFv kivágásával nyertük, ellenőriznünk kellett azt is, hogy a 7g6 scFv nem maradt-e vissza a plazmidban. Ebben az esetben ugyanis a 7g6 scFv tartalmú klónok nemcsak hogy szintén képesek a szelektív táptalajon kinőni, hanem megfelelő méretű PCR terméket is adhattak, mivel a VL és VH primerek a variábilis domének konzervatívabb szakaszaihoz kapcsolódnak. Az ellenőrzéshez a pET11d vektorhoz illeszkedő, és a klonozó helyet

felszaporító pET3 és pET5 elnevezésű primerekkel PCR reakciót végeztünk, és a kb. 1000 bázispár nagyságú terméket PstI enzimmel emésztettük. A PstI endonukleáznak a 7g6 scFv szekvenciájában 2 db hasítóhelye van, míg az FGK scFv szekvenciájában egy sem. Emésztés után a kapott szakaszok méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük (10. ábra). Az FGK scFv szekvenciáját hordozó telepek esetén az emésztetlen, 1000 bázispár nagyságú PCR terméket kaptuk, míg a 7g6 scFv-t tartalmazó telepeknél ennél kisebb, kb.400 illetve 100 bázispár méretű fragmentumokat. Kontrollként a 7g6 scFv-t tartalmazó pET11d vektort emésztettünk (pET-7g6). Az emésztés eredménye szerint a PCR szűrés alapján pozitív klónok többsége valóban az FGK scFv szekvenciáját hordozó plazmidot tartalmazott.



10. ábra.: Az FGK scFv és a 7g6 scFv szekvenciáját hordozó telepek elkülönítése a ligálás után. A szelektív táptalajon kinőtt telepekből PCR-rel felszaporítottuk a klónozó helyet, majd a kapott kb. 1000 bázispár méretű terméket emésztettük a PstI enzimmel, és a termékeket megfuttattuk 1,3 w/v%-os agaróz gélelektroforézissel. Csak a 7g6 scFv hasítódik PstI enzimmel, egy 400 és két 100 bp méretű szakaszra, az FGK scFv nem, így az emésztetlen, 1000 bp nagyságú termékek jelzik az FGK scFv szekvenciáját hordozó pozitív klónokat. A minták felett a klónok száma látható, M=DNS létra (fragmentált pBI-C3 plazmid), - : DNS templát nélküli kontroll minta

Az FGK scFv-t meg is szekvenáltuk. A szekvenálásokat a Biomi Kft (Gödöllő) végezte. A szekvenciában megtalálhatóak az immunglobulin doméneket kialakító ciszteinek, és az IMGT adatbázis segítségével azonosíthatóak a variábilis doméneket kialakító V-, D- illetve J szakaszok, valamint az antigén kötéséért felelős CDR régiók is (11. ábra), amely alátámasztja, hogy valóban egy immunoglobulin szekvenciát klónoztunk. A VL és a VH domének szekvenciáit elhelyeztük a Genbank nukleotid adatbázisban, a hivatkozási számuk a VL esetében HQ662569, a VH esetében HQ662570.

```

      AluI ag|ct15
NcoI c|catgg2
1  M D I E L T Q S P A L A V S P G E R V T
1  CCATGGATATTGAGCTGACCAATCTCCTGCTTTGGCTGTGTCTCCAGGAGAGAGGGTTA
                                     KpnI ggtac|cl11
21  I S C R A S D S V S T L M H W Y Q Q K P
61  CCATCTCCTGTAGGGCCAGTGACAGTGTCTAGTACACTTATGCACTGGTACCAACAGAAAC
                                     RsaI gt|ac93  RsaI gt|ac109
41  G Q Q P K L L I Y L A S S H L E S G V P A
121 CAGGACAGCAACCCAAATCCTCATCTATCTAGCATCACACCTAGAAATCTGGGGTCCCTG
                                     NdeII |gatc228
61  R F S G S G S G T D F T L T I D P V E A
181 CCAGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCTCACCATTGATCTGTGGAGG
                                     MboII |gatc228
81  D D T A T Y Y C Q Q S W N D P W T F G G
241 CTGATGACACTGCAACCTATTACTGTCTCAGCAGAGTTGGAATGATCCGTGGACGTTCCGGTG
      AluI ag|ct312
101 G T K L E L K R G G G G S G G G S G G
301 GAGGCACCAAGCTGGAATTGAAACGTGGTGGTGGTGGTAGCGGCGGCGGCTCTGGAG
      NdeII |gatc367
121 G G S E V Q V V E S D G G L V Q P G R S
361 GAGGAGGATCAGAGTGCAGTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGACGCTGGAAGGT
      MboI |gatc367  HinFI g|antc388
141 G G S E V Q V V E S D G G L V Q P G R S
361 GAGGAGGATCAGAGTGCAGTGGTGGAGTCTGATGGAGGCTTAGTGACGCTGGAAGGT
      HinFI g|antc449
141 L K L P C A A S G F T F S D Y Y M A W V
421 CCCTAAACTCCCCTGTGCAGCCTGAGATTCACCTTCAGTGACTATTACATGGCCCTGGG
      HinFI g|antc556
161 R Q A P T K G L E W V A S I S Y D G S S
481 TCCGCCAGGCTCCAACGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCAAGCATTAGTTATGATGGTAGTA
      TaqI t|cga552  HinFI g|antc572
181 T Y Y R D S V K G R F T I S R D N A K S
541 GCACTTACTATCTCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCAAAAA
      MboII gaagannnnnnnn|674
201 T L Y L Q M D S L R S E D T A T Y Y C G
601 GCACCTATACCTGCAAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGGC
      AluI ag|ct674  HinFI g|antc698
221 R H S S Y F D Y W G Q G V M V T V S S
661 GAAGACACAGTAGCTACTTTGATTACTTGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACCGTCTCCTCC

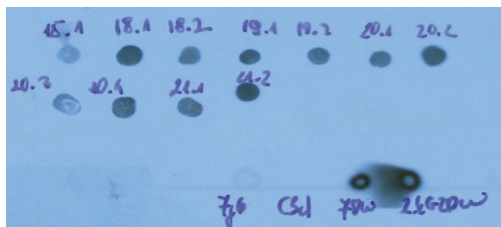
```

11. ábra: Az FGK scFv nukleotid és aminosav szekvenciája, a Sequence Manipulation Suite online programmal (University of Alberta, Canada) felvázolva. A szekvencia felett a restriktós enzimek hasítóhelyei láthatók; sárga színnel kiemeltük az immunglobulin domén szerkezetének kialakításához kellő, láncon belüli diszulfidhidakat képező ciszteineket. Narancssárga keret jelzi a linker régiót, zöld keret a variábilis régiók CDR szakaszait.

IV.1.3. Az egyláncú ellenanyag fehérje szintű meglétének igazolása

Az egyláncú ellenanyagot DNS szintű létrehozása után fehérje formában is elő akartuk állítani, majd igazolni, hogy jól termeltethető és tisztítható, továbbá hogy specifikus a CD40 receptorra.

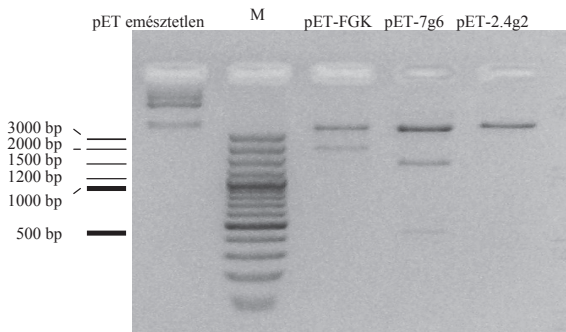
Az scFv szekvenciáját tartalmazó klónokat BL21 *E.coli* expressziós baktériumtörzsbe transzformáltuk, a baktériumokat növesztettük, és a fehérje termelésüket indukáltuk, majd a baktériumok lizátumát teszteltük dot blot módszerrel a myc-tag jelenlétére, anti-myc 9E10 ellenanyag segítségével. A baktériumok ezt a tag peptidet önmagukban nem szintetizálják, csak az scFv-khez kapcsolatosan fordulhat elő bennük. Az eredmények szerint a kiválasztott, DNS szinten pozitív klónok termelték is az FGK scFv-t (12. ábra). Negatív kontrollként a mérésnél a myc-tag-et nem hordozó C3d rekombináns fehérjét és a 7g6 teljes ellenanyagot használtuk, míg pozitív kontrollként a myc-tag-et szintén tartalmazó 7g6 scFv és 2.4g2 scFv szolgált.



12. ábra: Fehérje termelés szűrése az FGK scFv szekvenciáját hordozó telepekből, dot plot segítségével. A termelt fehérjét anti-myc-tag (9E10) és anti-egér IgG1-HRP ellenanyaggal mutattuk ki. A pontok mellett a klónok neve szerepel, a párhuzamosokat 1. és 2. jelöli. Negatív kontrollként a myc-tag-et nem hordozó C3d rekombináns fehérje és a 7g6 teljes ellenanyag, míg pozitív kontrollként a 7g6 scFv és a 2.4g2 scFv szolgált.

A DNS szintű és a fehérje szintű ellenőrzések alapján kiválasztottunk egy pozitív klónt (19-es klón), amellyel a további in vitro és in vivo kísérleteket terveztük. Ezt a klónt újból részletesen megvizsgáltuk KpnI és PstI restrikciós endonukleázokkal emésztve, hogy biztosan kizárjuk, hogy az előállítás során fellépő esetleges keresztszennyezés következtében nem véletlenül a 7g6 scFv, vagy egy harmadik, a laboratóriumban szintén sűrűn gyártott 2.4g2 scFv tartalmú klónnal dolgozunk. A PstI enzim egy helyen hasítja a pET11d vektort, és van

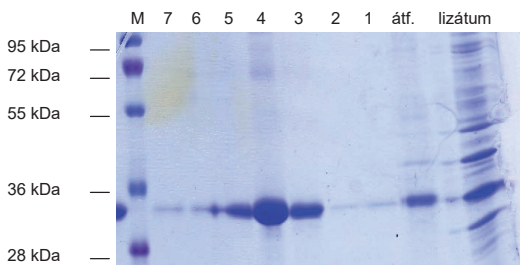
további két hasítóhelye a 7g6 scFv szekvenciájában, amelyből egy 400bp-nyi szakaszt ejt ki. A másik két említett scFv szekvenciájában nincs hasítóhelye. A KpnI enzim hasítja a könnyű lánc szekvenciáját a 106. nukleotid pozícióban az FGK scFv esetében, míg a másik két scFv szekvenciában nem hasít. Így tehát a két enzimmel történő emésztés során a 7g6 scFv-nél két nagyobb és egy 400 bp. méretű fragmentum, az FGK scFv-nél pedig egy 1990 bázispár méretű szakasz megjelenését vártuk, míg a 2.4g2 scFv konstrukciónál a vektor linearizálódására számítottunk a már említett egyetlen vektorbeli PstI hasítóhely miatt. Az emésztés után a termékeket agaróz gélelektroforézissel megfuttatva kimutattuk, hogy a 19-es klón vektorából egy 1990 bázispár méretű szakasz kiesett, továbbá a többi scFv tartalmú plazmidok mintázatától eltérő mintázatot ad, amely igazolta, hogy egyedi, és valóban az FGK scFv szekvenciáját tartalmazza (13. ábra). Továbbá a 19-es klónt meg is szekvenáltattuk, amely szintén megerősítette, hogy az FGK scFv szekvenciáját hordozza.



13. ábra: A továbbiakban használt FGK scFv-t tartalmazó vektort (a 19-es klón) emésztettük KpnI és PstI endonukleázokkal, majd a termékeket 1,5 v/w%-os agaróz gélelektroforézissel mutattuk ki. Az FGK scFv esetében egy 1990 bázispárnyi szakasz hasítódik ki, és ez a mintázat eltér a másik két egyláncú ellenanyag hasítási mintázatától, azaz biztosan különböző egyláncú ellenanyagokról van szó. M= DNS létra (GeneRuler 100bp DNA ladder, Fermentas).

Az FGK scFv méretét és a fehérje tisztítás hatékonyságát SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük. Az FGK scFv mérete 32-35 kDa körüli, amely megfelel az egyláncú ellenanyagok aminosav mennyisége alapján számolt átlagos méretnek (14. ábra). A kitermelés

hatékonysága kísérleteink szerint: 250 ml baktériumtenyészetből, 1,5 ml-es Ni-NTA oszlopos elválasztva 2-3 mg scFv-t tudunk előállítani, elhanyagolható mennyiségű bakteriális fehérje szennyezéssel.

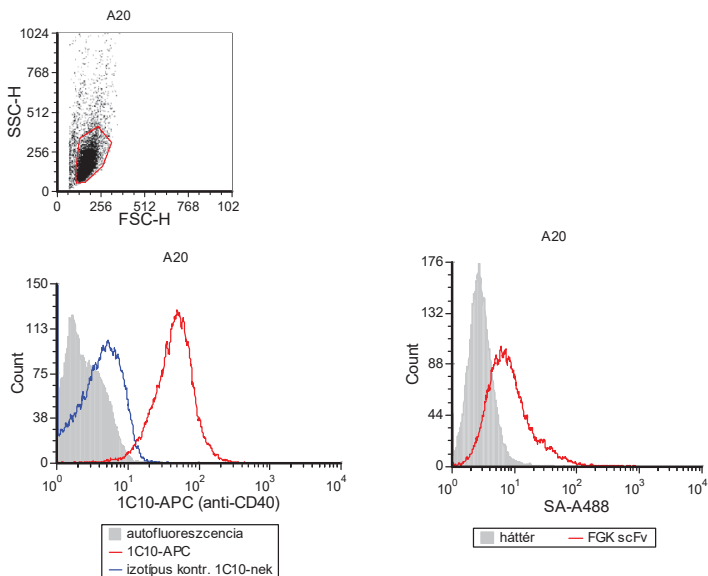


14. ábra.: Az FGK scFv tisztaságának és méretének ellenőrzése affinitás kromatográfiát követően (1-7 a frakciók) 12%-os SDS-PAGE gélen, Coomassie Brilliant Blue festékkel festve. A preparátum tisztának bizonyult, az scFv mérete 32-35 kDa körüli, amely az scFv aminosavszekvencia alapján számolt méretének megfelel.

IV. 1.4. Az FGK scFv kötődésének jellemzése A20 sejtvonalon és primer sejteken

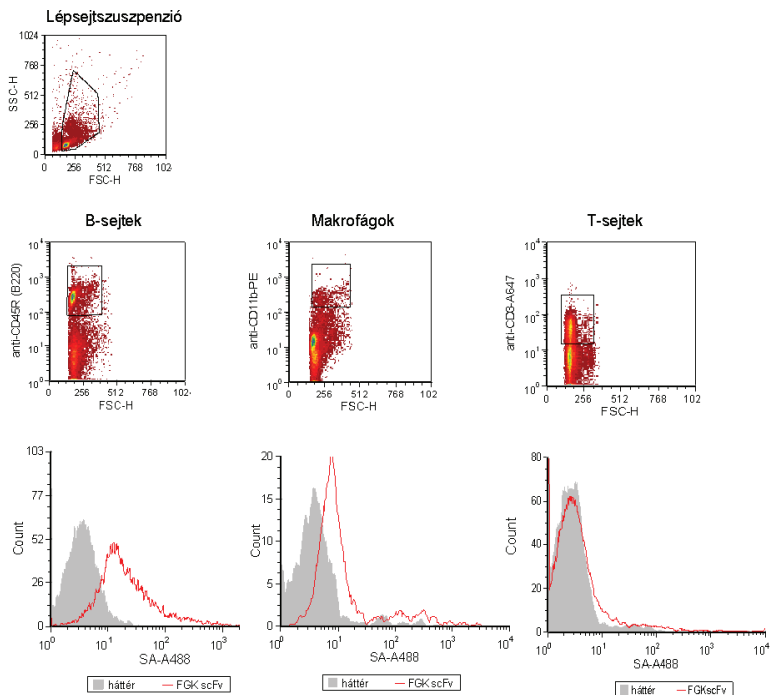
Következő lépésként ellenőriztük és jellemeztük az FGK scFv-nek az egér CD40 receptorhoz való kötődését áramlási citofluorimetriás vizsgálatokkal. Ezekben a kísérletekben az scFv-t enzimatis úton biotiniláltuk, és kötődését fluoreszcens festékkel jelzett sztreptavidinnel (pl. SA-Alexa 488 vagy SA-Alexa 647) detektáltuk.

Az A20 egér B limfóma sejtvonalról ismert, hogy kifejezi a CD40 receptort (166), amelyet monoklonális anti-egér CD40 ellenanyag (1C10) segítségével mi is megerősítettünk (15. ábra). Az FGK scFv szintén kötődött az A20 sejtekhez.

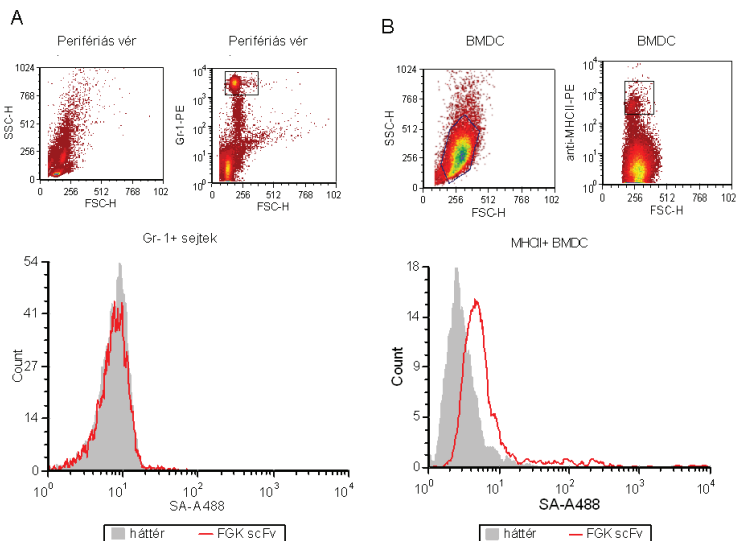


15. ábra.: Az FGK scFv, akárcsak az anti-CD40 (1C10) ellenanyag, kötődik a CD40pozitív A20 B limfóma sejtvonalhoz, áramlási citofluorimetriával vizsgálva. A biotinizált FGK scFv kötődését a sejtekhez SA-A488 reagenssel mutattuk ki, a háttér a SA-A488 jele önmagában.

Primer sejteken, úgymint lépszuszpenzióból származó limfocitákon és makrofágokon, perifériális vér eredetű granulocitákon, és DC (BMDC) sejteken is jellemeztük az FGK scFv kötődését, hiszen egy *in vivo* kísérlet során, az oltás módjától függően, főként ezekkel az APC-kel illetve sejtpopulációkkal találkozhat leginkább az FGK scFv. A DC-khez való kötődés vizsgálatához BMDC-ket alkalmaztunk, mint elfogadott DC modellsejteket. Az FGK scFv kötődött az irodalom szerint CD40 receptorral rendelkező B-sejtekhez, CD11b pozitív makrofágokhoz (16. ábra), valamint az MHCII receptort nagy számban expresszáló, azaz érett BMDC-khez is (17. B ábra). Emellett kimutattuk, hogy nem kötődik a T-sejtekhez (16. ábra) és a Gr-1+ granulocitákhoz (17. A ábra).



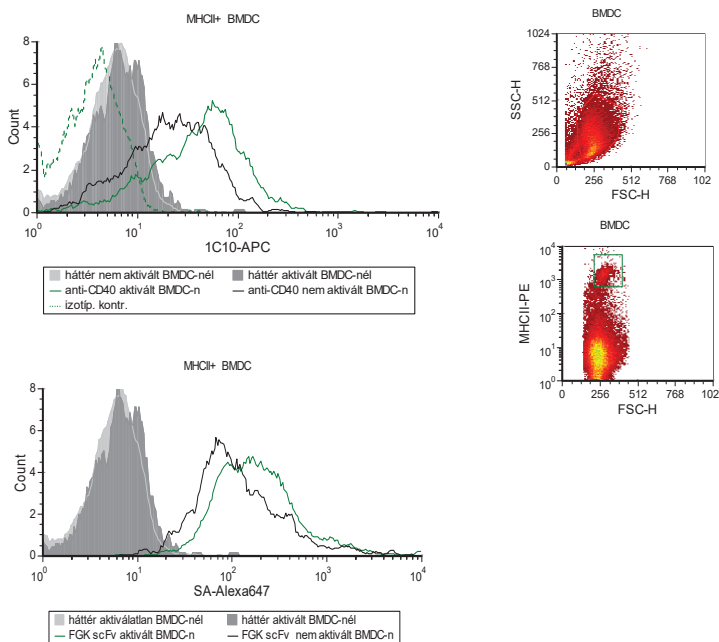
16. ábra.: Az FGK scFv kötődött lépsejtszuspenzió eredetű B-sejtekhez és makrofágokhoz, ám nem kötődött T-sejtekhez, áramlási citofluorimetriával vizsgálva. A biotinilált scFv-t SA-Alexa 488 segítségével mutattuk ki, a háttérkötődés a SA-Alexa 488 jele a sejteken. A dot plotokon az egyes sejtpopulációk kapuzása látható.



17. ábra: Az FGK scFv kötődését ellenőriztük (A) neutrofil granulocitákon és (B) BMDC sejteken is, áramlási citofluorimetriával vizsgálva, ahol a biotinizált scFv-t SA-Alexa 488 segítségével mutattuk ki. A Gr1 pozitív neutrofil granulocitákhoz nem kötődött az FGK scFv, míg az MHCII pozitív, érett BMDC-khez kapcsolódott. A háttér a detektáló SA-A488 jele önmagában, a dot plotokon az egyes sejtpopulációk kapuzása látható.

IV.1.5. Az FGK scFv kompetál az eredeti FGK45.5 ellenanyaggal a CD40 receptorhoz való kötődésben

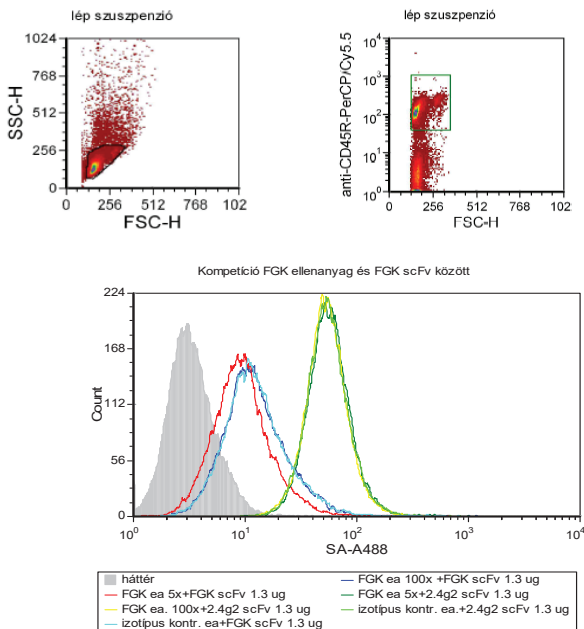
A következő lépésben ellenőrizni akartuk, hogy az FGK scFv valóban egér CD40 specifikus-e. Ezért egyrészt BMDC sejteken mértük a CD40 receptor expressziójának változását CpG oligonukleotiddal való aktiváció hatására, amelyről ismert irodalmi adatok alapján, hogy fokozza az aktivált, érett DC-ken az említett receptor megjelenését, a nem aktivált sejtekhez képest. Eredményeink szerint a CpG-vel aktivált BMDC sejteken anti-CD40 ellenanyaggal valóban magasabb CD40 receptor expressziót tudtunk kimutatni az aktiválatlan sejtekhez képest, és ezt a kötődési mintázatot követte az FGK scFv is (18. ábra).



18. ábra: Az anti-CD40 (1C10) ellenanyag és az FGK scFv kötődése a nem aktivált (fekete), illetve a CpG-vel aktivált (zöld) BMDC sejteken. A CD40 expressziója fokozódott az aktivált sejteken, amelynek megfelelően nőtt az FGK scFv kötődése is ezekhez a sejtekhez. Az érett BMDC-eket az MHCII pozitivitásuk alapján különítettük el (kapuzás a jobbalsi dot plotokon látható). A biotinilált scFv-t SA-Alexa 647 segítségével detektáltuk, a háttér a SA-A647 jele önmagában.

Másrészt ahhoz, hogy egyértelműen kimondhassuk, az FGK scFv az egér CD40 receptort ismeri fel, kompetíciós vizsgálatot végeztünk közte és az eredeti teljes ellenanyag között egér lép eredetű B sejteken, áramlási citofluorimetria segítségével. A kísérlet szerint az FGK scFv dózis függően leszorítható receptoráról az FGK45.5 teljes ellenanyag jelenlétében, míg az scFv kötődése változatlan a teljes ellenanyaggal megegyező koncentrációjú izotípus kontroll ellenanyag mellett (19 ábra). Kimutattuk azt is, hogy a CD16 és CD32 receptorokra specifikus 2.4g2 scFv kötődését nem befolyásolta az FGK45.5 ellenanyag, azaz a kompetíció

az FGK scFv és a teljes ellenanyag között a specificitásuktól függő, nem módosítja pl. az scFv-k oldatában lévő stabilizáló anyagok hatása. A kísérlet igazolta, hogy a CD40 receptorra specifikus az előállított FGK scFv.



19 ábra: Kompetíció vizsgálata FGK scFv és FGK45.5 teljes ellenanyag között, lép eredetű B-sejteken. A mérés során a biotinilált scFv kötődését detektáltuk SA-Alexa 488 reagenssel. Az FGK scFv (sötétkék) leszorult receptoráról 5x hígítású FGK45.5 ellenanyag jelenlétében (piros), míg a teljes ellenanyaggal azonos koncentrációjú és hígítású izotípus kontroll ellenanyag mellett nem (világoskék). A kontrollként használt 2.4g2 scFv nem szorítható le a sejtekről FGK45.5 ellenanyag jelenlétében (zöldek). A háttér a SA-A488 jele önmagában, a B-sejtek kapuzása a dot plotokon látható.

IV.2. Az scFv-k által irányított célzó komplexek kötődésének jellemzése

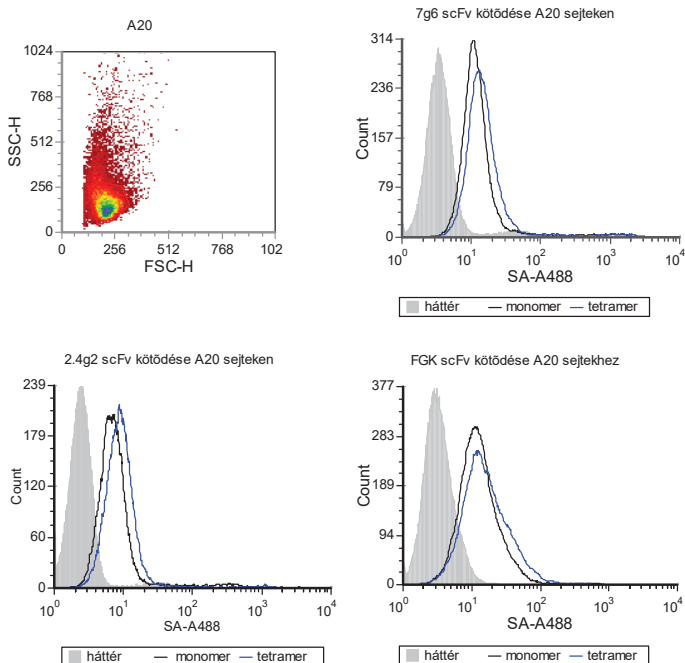
Elgondolásunk szerint az antigénspecifikus immunválaszt modulálni lehet, ha az antigéneket irányítottan juttatjuk el az immunválasz elindításában és kialakításában nélkülözhetetlen receptorokhoz, mint például a CR1/2, a kis affinitású FcγRII és III, illetve a CD40 receptorok.

A receptorok célzását rekombináns egyláncú ellenanyagokkal végeztük, mivel megőrzi az eredeti ellenanyag specificitását, viszont az Fc-részük hiányában nem kötődnek más receptorokhoz, nem indukálnak komplement aktivációt sem, azaz a mért hatás csak a célzott receptorhoz kapcsolható. Kísérleteinkben a már említett és karakterizált FGK45 scFv mellett az egér CR1/2-t felismerő 7g6 scFv-t, és az egér FcγRII és III receptorokhoz kötődő 2.4g2 scFv-t alkalmaztuk. A 7g6 scFv előállítása és jellemzése Dr. Prechl József (58), míg a 2.4g2 scFv részletes leírása Dr. Angyal Adrienn nevéhez fűződik (88). Munkacsoportunk korábbi kísérletei szerint az mCR1/2 scFv nem bizonyult elég hatékonynak a hozzákapcsolt antigén elleni erőteljes immunválasz kiváltásában. Feltételezésünk szerint ezen javítani lehetne az scFv valenciájának növelésével, és egyéb, az immunválasz kialakításában fontos receptorok egyidejű célzásával.

A célzó komplexeink a monobiotinilált egyláncú ellenanyagoknak sztreptavidinnel, illetve sztreptavidinnel fedett mikrogyöngyökkel való konjugációjával készültek, és modell antigénként a sztreptavidin, illetve az scFv-khez kapcsolt myc-tag és hexahisztidin-tag peptidek szolgáltak.

IV.2.1. A sztreptavidin (SA) alapú célzó komplexek kötődésének jellemzése

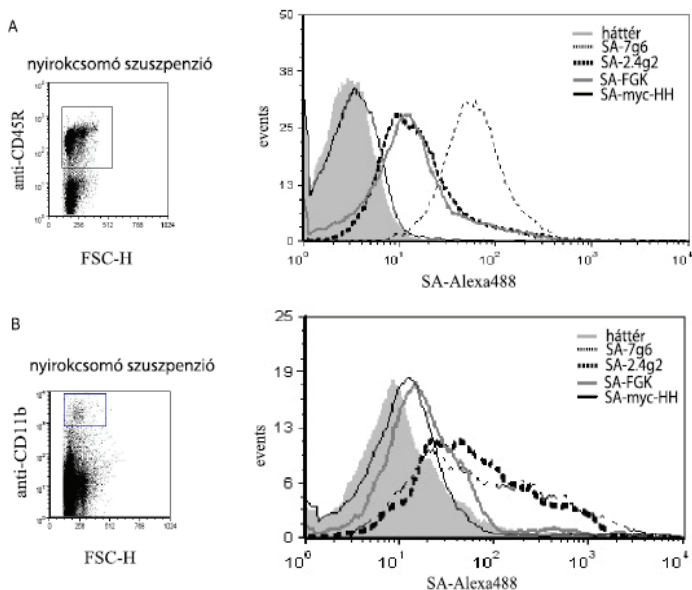
Az *in vivo* kísérletek előtt ellenőrizni akartuk, hogy a komplexek irányító egységeiként szolgáló scFv-k célreceptorukhoz való kötődési képességét nem befolyásolta-e a biotiniláció – annak ellenére, hogy a minimálisan agresszív enzimátikus biotinilálást alkalmaztuk a kémiai helyett -, vagy a sztreptavidinnel való konjugáció. Áramlási citofluotiméterrel jellemeztük a monomer és a sztreptavidinnel előre konjugált, tetramer egyláncú ellenanyagok kötődését A20 B limfóma sejtvonalon (20. ábra), amely hordozza felszínén a CR1/2, az FcγRII/III és CD40 receptorokat. A 7g6, a 2.4g2 és az FGK45 scFv-k kötődtek a sejtekhez mind monomer, mind tetramer formában, továbbá a tetramer forma hasonló mértékben ismerte fel a célreceptort, mint a monomer forma, azaz az scFv-k biotinilálása és sztreptavidinnel való konjugálása nem változtatta meg a célreceptorhoz való kötődésüket



20. ábra: Áramlási citofluorimetriával kimutattuk A20 sejteken, hogy az egyláncú ellenanyagok kötődési képessége a célreceptorokhoz nem változik a tetramerizáció során. A monomer scFv-k esetében a sejteket előbb kezeltük az egyláncú ellenanyagokkal, majd a következő jelölési lépésben adtuk hozzájuk a SA-Alexa 488 reagenst. A tetramer scFv-k mérésénél a SA-A488 reagenssel előre konjugált scFv-k kötődését elemeztük. A háttér minden esetben a SA-A488 jele önmagában a sejteken.

Kezeletlen Balb/C egerekből nyert nyirokcsomó eredetű primer sejteken is ellenőriztük az SA-scFv komplexek kötődését, hiszen a későbbi *in vivo* kísérletekben, szubkutan oltásnál, főként közülük kerülhetnek ki a célsejtek. A 7g6 scFv, az FGK scFv és a 2.4g2 scFv-k a korábbi jellemzésük szerint elsősorban a B-sejtekhez és a CD11b receptort kifejező makrofágokhoz kapcsolódnak, ezért komplexeiknek ezeken a sejtípusokon való megjelenését elemeztük áramlási citofluorimetriával (21. ábra). Az *in vivo* kísérletek során kontroll

kompleként a myc- és his-tag peptiddel konjugált sztreptavidint használtuk, ezért ennek is ellenőriztük a primer sejtekhez való kapcsolódását.



21. ábra.: A különböző, biotinilált scFv-k Alexa488 fluoreszcens festékekkel jelölt sztreptavidinnel (SA-A488) alkotott komplexekinek kötődését elemeztük áramlási citofluorimetriával, nyirokcsomó eredetű sejtuszupenzió. Az scFv-k kötődését a sztreptavidinnel való konjugációjuk nem befolyásolta (A) sem a B-sejtekhez, sem (B) a CD11b receptort kifejező makrofágokhoz. A háttér minden esetben a SA-A488 jel önmagában. SA-myc-HH: szintetikus myc-his-tag peptidet tartalmazó, kontroll komplex.

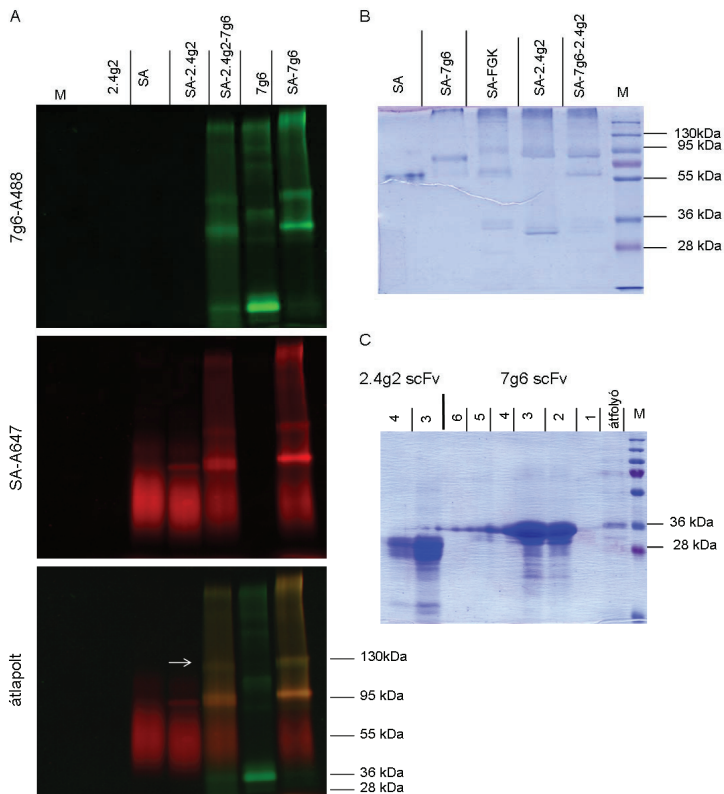
Az eredmények szerint az SA-scFv komplexek kötődnek mind a B, mind a CD11b pozitív sejtekhez az scFv-k korábban tapasztalt kötődési képességeinek megfelelően, és nagyobb mértékben, mint a kontrollként használt SA-myc-HH komplex. Az SA-scFv komplexek tehát képesek eljuttatni az antigéneket a célsejtekhez.

IV.2.2. Két különböző scFv-t tartalmazó sztreptavidin alapú komplexek kimutatása

Az APC-k két különböző receptorának egyidejű célzásához olyan komplexeket alkalmaztunk, amelyeknél a SA-hez két különböző specificitású scFv-t egyszerre konjugáltunk. Ilyenkor többféle összetételű komplex kialakulhat, de az eltérő receptorok tényleges keresztkötéséhez a két különböző scFv egyazon SA-n való megjelenése kell, amely komplexek létezését SDS-PAGE módszerrel igazoltuk.

Alexa647 fluoreszcens festékkel jelölt SA-t konjugáltunk 2.4g2 scFv-vel és/vagy Alexa488 festékkel jelölt 7g6 scFv-vel, egy-egy scFv-re nézve 1:1 tömegarányban (ez azt jelenti, hogy a két különböző scFv-t hordozó SA-nál az SA:scFv tömegarány 1:2, azaz telítődött lett). A SA-2.4g2 1:1 tömegarányú konjugátumoknál egy scFv-egy SA összetételű komplexek megjelenését tapasztaltuk az SDS-PAGE gélképen, mivel a kapott méret megfelelt a 30 kDa-os 2.4g2 scFv és a 60kDa-os SA méreteinek összegével (22. A ábra). Emellett valamennyi SA vissza is maradt, mivel az alkalmazott 1:1 tömegarány nem telítődött. A SA-7g6 esetében viszont 1:1 scFv:SA tömegarány mellett egy scFv-egy SA és két scFv-egy SA összetételű komplexek is keletkeztek a méret alapján, miközben valamennyi szabad SA is maradt. A 2.4g2 scFv és a 7g6 scFv mérete között pár kDa eltérés van (22. C. ábra), amely különbség a SA-7g6 és a SA-2.4g2 komplexek méreteiben is megmutatkozott. A SA-2.4g2-7g6 kettős komplexek SDS-PAGE képe azt mutatta, hogy kialakulnak olyan komplexek, amelyekben a SA egy-egy scFv-t hordoz, és emellett megjelenik a 2.4g2-7g6-SA tartalmú komplex méretének megfelelő csík is, amely annyi kicsi, mint a SA-7g6 komplexek méreténél, amennyivel a két scFv mérete különbözik. A kísérlet jelzi, hogy a komplexek kialakulását befolyásolja az scFv-k biotinizálási és degradációs foka, hiszen a 2.4g2 scFv pár héttel régebbi preparátuma ugyanolyan SA:scFv tömegarány mellett rosszabbul konjugálódott, mint a friss 7g6 scFv, ezért az *in vivo* kísérleteknél mindig friss scFv preparátumokkal dolgoztunk.

Az ugyanolyan összetételű konjugátumokat SDS-PAGE gélen futtatva és Coomassie festékkel festve is ellenőriztük a konjugátumok méretét (22. B ábra). Erre azért is volt szükség, mivel a fluoreszcens detektáláshoz nem volt alkalmas molekulatömeg létránk, és a komplexek méretét a gélek utólagos Coomassie festésével határoztuk meg. Ekkor ugyan a létra szépen festődött, de a komplexek csíkjai nagyrészt elkenődtek, amelynek háttérében a fluoreszcens festékek zavaró hatása állhat. A Coomassie festés a komplexek összetételére nem szelektív, nem különböztethető meg a kettős, SA-7g6-2.4g2 scFv konjugátumokban a különböző összetételű komplexek, viszont a méretek igazolására alkalmas.



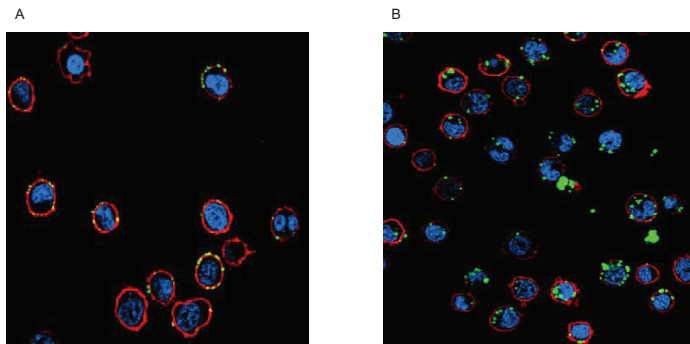
22. ábra: Különböző scFv tartalmú konjugátumok kimutatása. (A) SA-A647-t (piros) konjugáltunk 2.4g2 scFv-vel és A488 festékkel jelölt 7g6 scFv-vel (zöld), külön-külön és együtt is. A komplexeket nem redukáló körülmények között futtattuk SDS-PAGE módszerrel (10%-os gél), majd Typhon fluoreszcens szkennerral detektáltuk. A kettős komplexek (SA-2.4g2-7g6) esetében a 130kDa körül (nyíl) mindkét szín megfigyelhető, és hajszálnyival kisebb, mint a SA-7g6 komplexeknél a két scFv-t hordozó komplex szintén kb. 130kDa-s jele, mivel a 2.4g2 scFv pár kDa-nal kisebb a 7g6 scFv-nél. (B) A SA és a SA-scFv komplexek közelítő méretét, illetve (C) a 7g6 scFv és a 2.4g2 scFv (tisztítás utáni frakciók) eltérő méretét mutatják a Commassie festéssel készült SDS-PAGE gélek (12%-os illetve 10%-os gél).

M: molekulatömeg létra

IV.2.3. A sztreptavidinnel fedett mikrogyöngy (msSA) tartalmú komplexek jellemzése

Az *in vivo* kísérletek során alkalmaztunk olyan komplexeket is, ahol az scFv-ket sztreptavidinnel fedett, 510 nm-es átmérőjű mikrogyöngyökkel konjugáltuk, mivel ismert, hogy a nano- és mikrogyöngyök növelik az immunválasz hatékonyságát a hozzájuk kapcsolt antigénre. A mikrogyöngyök ezen kívül fokozták az scFv-k valenciáját is. Mivel korábban nem használtunk mikrogyöngyöket vizsgálatainkban, ezért az *in vivo* kísérletek előtt jellemeztük a mikrogyöngyök illetve az msSA-scFv komplexek kialakítását, kötődését és *in vivo* lokalizációját.

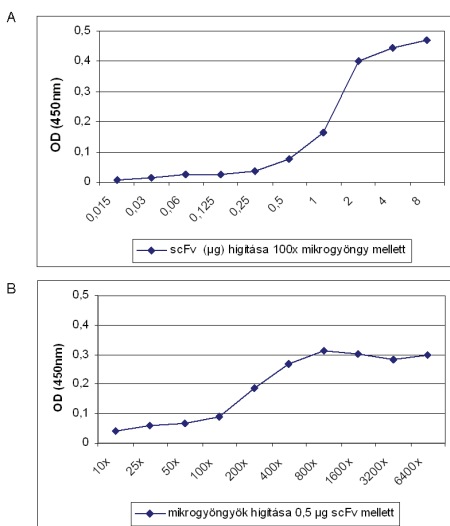
Feltételeztük, hogy az 510 nm-es átmérőjű gyöngyöket a méretük miatt elsősorban a makrofágok fogják felvenni. Ennek vizsgálatához P388 elnevezésű egér makrofág sejtvonalat kezeltünk a DragonGreen fluoreszcens festékkel töltött mikrogyöngyökkel jégén, illetve szobahőmérsékleten, egy órán át, majd konfokális fluoreszcens mikroszkópia segítségével kimutattuk, hogy a makrofág sejtek valóban megkötik, majd fel is veszik az 510 nm-es mikropartikulumokat (23. ábra).



23. ábra: Konfokális mikroszkópiával kimutattuk, hogy a P388 egér makrofág sejtekhez (A) kötődik az 510 nm átmérőjű mikrogyöngy, egy órás, jégén való inkubációt követően, míg (B) egy órás 37 °C-os kezelés után a sejtek fel is vették a gyöngyöket. Zöld szín: Dragon Green fluoreszcens festékkel töltött mikrogyöngy, piros: choleratoxinB-Alexa566 membránfesték, kék: Draq5 magfesték.

A következőkben jellemeztük az msSA-scFv komplexek képződését ELISA módszerrel, mivel arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen tömegarányban kell keverni a

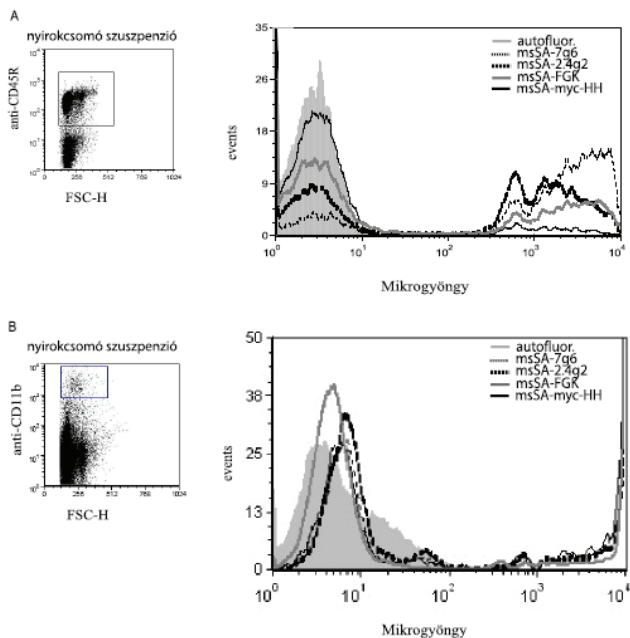
monobiotinilált scFv-kel az msSA mikrogyöngyöket, hogy azok az scFv-kre nézve telítettek legyenek, ám feleslegben se maradjon scFv (24. ábra). Eredményül egy titrálási görbét kaptunk, amelyről a komponensek szükséges konjugálási aránya könnyen meghatározható, és amely azt is jelzi, hogy a pontos sztreptavidin és monobiotinilált egyláncú ellenanyag mennyiségének ismeretében sztöchiometrikusan tudunk számolni a konjugálásnál. Az adatok szerint ideális konjugátumnak a 0,5 µg scFv-ből és 100x hígítású, azaz közelítőleg 0,25 µg SA-t hordozó mikrogyöngyből keletkezett komplex bizonyult. A későbbiekben ezt az 2:1 scFv:SA tömegarányt használtuk az msSA-scFv komplexek előállítására.



24. ábra: Monobiotinilált scFv-ket konjugáltunk sztreptavidinnel fedett mikrogyöngyökkel, állandó mikrogyöngy (A) illetve állandó scFv (B) koncentráció mellett. A visszamaradt szabad scFv mennyiségét mértük anti-myc-tag (9E10) ellenanyaggal fedett ELISA lemezen. Eredményként titrálási görbéket kaptunk, amely jelzi, hogy sztöchiometrikus szabályok szerint lehet számolni a komponensekkel a konjugálásnál.

Megvizsgáltuk azt is, hogy változnak-e a mikrogyöngyökkel konjugált egyláncú ellenanyagok kötődési képességei a célsejtekhez, elsősorban a B-sejtekhez és a

makrofágokhoz, a konjugációt követően. Az áramlási citofluorimetriás kísérlet alapján az msSA-scFv komplexek kötődése a B-sejtekhez változatlan a konjugáció után; a 7g6 scFv így is a leghatékonyabban kötődik, és minden komplex kötődése jobb a kontroll peptidet tartalmazó msSA-Myc-HH komplex kötődésénél (25.A ábra). Az msSA komplexek kötődésénél több csúcs látható, megfelelően annak, hogy 1, 2, 3, ... stb. db mikrogyöngy kapcsolódott a sejtekhez.

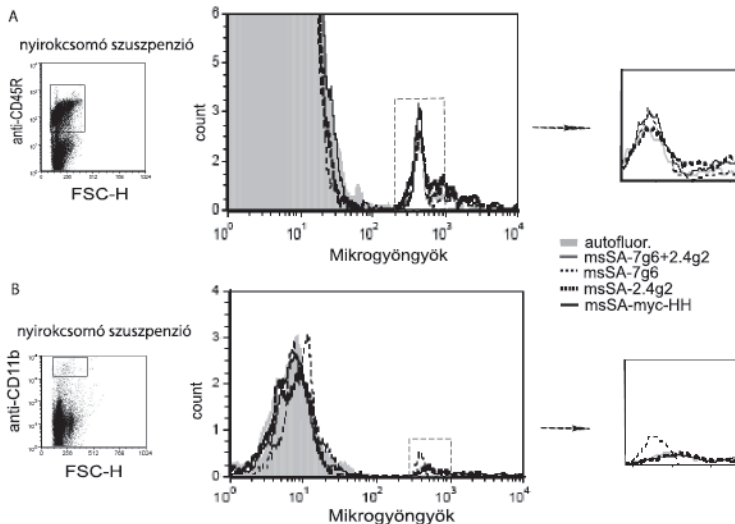


25. ábra: A Dragon Green festékkel töltött és sztreptavidinnel fedett 510 nm-es mikrogyönggyel (msSA) konjugált 7g6 scFv, 2.4g2 scFv és FGK scFv (msSA-7g6, msSA-2.4g2) kapcsolódott a nyirokcsomó eredetű (A) B-sejtekhez a kontroll msSA-myc-HH komplexekhez viszonyítva, az egyes scFv-k kötődési képességeinek megfelelő mértékben. (B) A makrofágokhoz mindegyik msSA komplex kötődik, még a csak myc-HH peptidet hordozó kontroll komplex is, azaz az antigén eljuttatása hozzájuk mikrogyöngy függő és scFv független.

Látható, hogy több B-sejt köt meg egyszerre több msSA-7g6 komplexet, míg msSA-2.4g2-t inkább egyesével kötnek a sejtek. A kötődést befolyásolhatja a nano- és mikrogyöngyöknél előforduló aggregáció is, amely a homogén eloszlást rontja. Ezzel magyarázható, hogy alapvetően minden B-sejt CR1/2 pozitív, ám az msSA-7g6 komplexek által nem minden B-sejt jelölődött. A CD11b fehérjét fokozottan kifejező makrofágok esetében minden komplex, a kontroll peptidet tartalmazó is, egyformán kötődik (25.B ábra), amely jelzi, hogy a makrofágok valóban hatékonyan megkötik a mikrogyöngyöket, ám nem érvényesül az egyláncú ellenanyagok általi irányítás. Az eredmények kimutatták tehát, hogy a mikrogyöngy-scFv komplexek kötődnek a B-sejtekhez és a makrofágokhoz, így képesek eljuttatni a kapcsolt antigéneket a célsejtekhez.

In vivo kísérletekben megvizsgáltuk, hogy a különböző msSA-scFv komplexek szubkután oltást követően hova kerülnek a szervezetben, elérik-e a legközelebbi nyirokcsomókat, és ott milyen sejtekhez tudnak kapcsolódni. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a lokalizációjukban tükröződik-e a hordozott scFv-k általi irányítás, hiszen az *in vitro* kötődési mérések nem voltak egyértelműek e tekintetben. Hét nappal az msSA-scFv komplexekkel történt oltást követően a környéki nyirokcsomókat kivettük, feldolgoztuk, és áramlási citofluorimetriával visszamértük a fluoreszcens festékkel töltött mikrogyöngyöket a B-sejteken és a CD11b+ makrofágokon, mivel ezekhez a sejt típusokon vártuk a kapcsolódásukat az *in vitro* eredmények alapján. Mind a B-sejteknek (26. A ábra), mind a makrofágoknak (26. B. ábra) csak 1-2 %-án találtunk mikrogyöngyöket, és a konjugált scFv-k specifikitása nem befolyásolta a kötődésüket, minden konjugátum azonos mértékben képes kötődni a célsejtekhez.

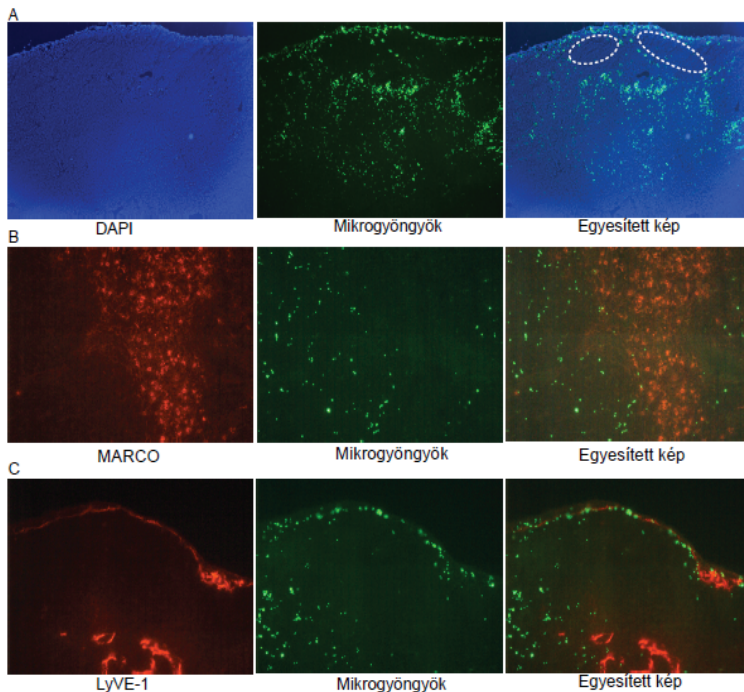
Az érintett nyirokcsomókból metszeteket készítve megvizsgáltuk az msSA-scFv komplexek lokalizációját fluoreszcens mikroszkópiával is. Ezt az eljárást lehetővé tette, hogy a kísérletben használt mikrogyöngyök Dragon Green festékkel voltak feltöltve. Az eredmények szerint a mikrogyöngyök, függetlenül a kapcsolt scFv-ktől, a nyirokcsomók szinuszhálózatában, főként a szubkapszuláris szinusz területén helyezkednek el, a B-sejtes területen kívül (27. A. ábra). A szinuszhálózat elemeinek további vizsgálata kimutatta, hogy a mikrogyöngyök nem kapcsolódnak a medulláris makrofágokhoz, amelyeket a MARCO (167) nevű struktúrájuk festésével mutattunk ki (27. B. ábra). Ugyanakkor kötődnek a LyVE-1 ellenanyaggal jelölt limfatikus endotél sejtekhez (168), különösen a szubkapszuláris szinusz területén (27. C ábra).



26. ábra: Az msSA-scFv konjugátumok lokalizációját vizsgáltuk a környéki nyirokcsomó (A) anti-CD45R+ B-sejteihez, illetve (B) CD11b+ makrofágaihoz szubkután oltásukat követően, áramlási citofluorimetriával. A mikrogyöngyök Dragon Green fluoreszcens festékkel töltöttek. A B-sejtek és a makrofágok kis százalékaához kapcsolódtak csak az msSA-scFv komplexek - a felnagyított kötődési képük látható a kis négyzetben -, és a hordozott scFv-knek nem volt hatásuk a komplexek kötődésére.

Az áramlási citofluorimetriás és a mikroszkópos adatokat összevetve elmondhatjuk, hogy az msSA-scFv komplexek eljutnak szubkután oltás után a legközelebbi nyirokcsomókba, ám a lokalizációjuk független a hordozott scFv-től. A fluoreszcens mikroszkópia kimutatta az msSA tartalmú komplexeket a B-sejtes zónákon kívül, a szinuszhálózat területén. Ennek ellentmondva, az áramlási citofluorimetria adatai szerint a nyirokcsomó eredetű B-sejtek és a CD11b+ makrofágok kis százalékaához közvetlenül kapcsolódnak a mikrogyöngyök. A mikroszkópiával nem sikerült sejtekhez lokalizálni a mikrogyöngyöket, aminek az lehet az oka, hogy a mikrogyönggyel kapcsolódott sejtek kevesen vannak (B-sejtek vagy makrofágok 1-2 %-a) ahhoz, hogy egy 10 μ m vastagságú

metszetben „tetten érhetőek” legyenek. Az egyes msSA-scFv komplexek lokalizációjában nem észleltünk különbséget, ezért a dolgozatban csak az egyik komplex adatait mutatjuk be.



27. ábra: Az msSA-MyHH komplex lokalizációja szubkután oltást követően 7 nappal a legközelebbi nyirokcsomókban. (A) Az 510 nm-es mikrogyöngyök (Dragon Green, zöld) elhelyezkedése a nyirokcsomó szinuszoid hálózatának mintázatát tükrözi. A szubkapszuláris szinusz területe és a medulláris szinuszoid hálózat is festődik. A szaggatott fehér vonalak a B-sejt follikulusokat mutatják, míg a kék szín a DAPI anyaggal festett sejtmagokat jelzi. (B) A mikrogyöngyök nem lokalizálódnak MARCO specifikus ellenanyaggal jelölt (vörös) medulláris makrofágokhoz, ugyanakkor (C) a LyVE-1 specifikus ellenanyaggal jelzett limfatikus endotél sejtekhez kötődnek, elsősorban a szubkapszuláris szinusz területén.

IV.3. A humorális immunválasz befolyásolása egyláncú ellenanyagokkal irányított antigének segítségével

Miután kimutattuk, hogy szolubilis sztreptavidinnel, illetve az 510 nm-es átmérőjű, sztreptavidinnel fedett mikrogöngyökkel alkotott scFv komplexek kötődnek a B-sejtekhez és makrofágokhoz is, azaz az antigént eljuttatják hozzájuk, egereket immunizáltunk a következő tartalmú komplexekkel:

- a) 7g6 és 2.4g2 scFv,
- b) FGK és 2.4g2 scFv.

Mindkét esetben az egyféle egyláncú ellenanyagot tartalmazó komplexek mellett alkalmaztunk olyanokat is, amelyek mindkét egyláncú ellenanyagot hordozták, megvalósítva ezzel a különböző receptorok egyidejű célzását. A komplexeknek a dolgozatban használt rövidítéseit a 1. táblázat foglalja össze.

a komplexek alapja	célzott receptorok					nincs
	CR1/2	FcγRII/III	CR1/2 és FcγRII/III	CD40	CD40 és FcγRII/III	
SA	SA-7g6	SA-2.4g2	SA -7g6+2.4g2	SA-FGK	SA -FGK+2.4g2	SA-myc-HH
msSA	msSA-7g6	msSA-2.4g2	msSA -7g6+2.4g2	-	-	msSA-myc-HH

1. Táblázat: Az *in vivo* kísérletekben alkalmazott célzó komplex elnevezései, amelyek sztreptavidinnel (SA) vagy sztreptavidinnel fedett mikrogöngyökkel (msSA) konjugált scFv-kből, illetve a kontroll, irányítást nem tartalmazó komplexnél biotinilált szintetikus myc-hexahisztidin-tag peptidből (myc-HH) állnak.

IV.3.1. Szuboptimális antigéndózis melletti immunizációs mód kiválasztása

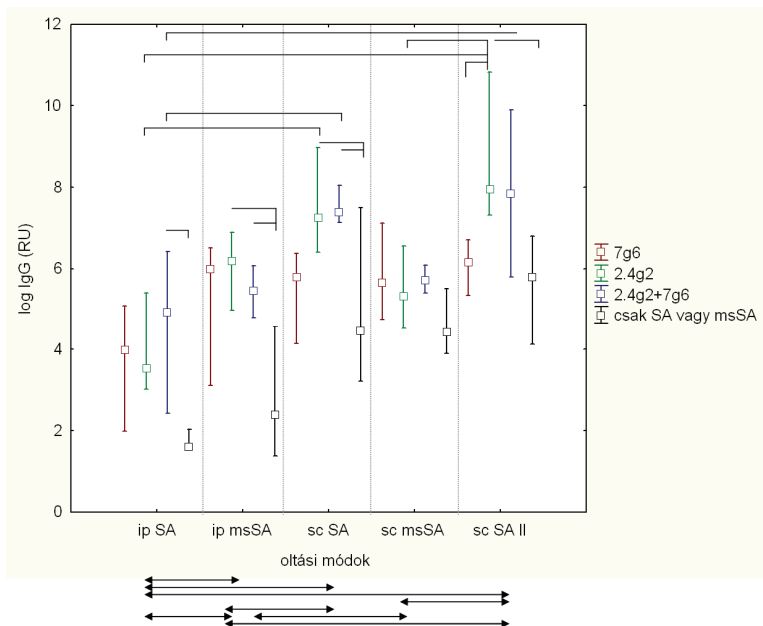
Az immunizálást megelőzően előkísérleteket végeztünk az antigének mennyiségének, az oltás helyének és az immunizálás időtartamának a kiválasztásához: szubkután és intraperitoneális oltási módokat próbáltunk ki a SA-scFv és az msSA-scFv csoportokkal, a kialakult immunválaszt az anti-SA IgG ellenanyag szinttel jellemeztük ELISA módszer segítségével (28. ábra). 28 napos oltási protokolt követve az adatok azt mutatták, hogy a SA-scFv csoportok esetében a szubkután oltás hatékonyabb az intraperitoneális oltáshoz hasonlítva: szignifikánsan nőtt az ellenanyagválasz a 2.4g2 scFv-t tartalmazó, illetve a kontroll csoportoknál is. Az msSA-scFv csoportoknál nem volt ilyen látványos különbség a két oltási mód hatásában, kivéve a csak antigént tartalmazó kontroll csoportoknál, ahol a szubkután oltás erőteljesebb IgG választ eredményezett. Emellett kimutattuk azt is, hogy négyszeres antigén dózis nem javított szignifikánsan a SA-scFv csoportok hatékonyságán, így 5 µg SA és 10 µg scFv s.c. oltása megfelelőnek bizonyult az immunválasz kiváltásához.

Az előkísérletek alapján a következő immunizálást használtuk az *in vivo* kísérletekben: az egerek oltásonként 5 µg SA és 10 µg scFv tartalmú msSA-scFv vagy SA-scFv komplexeket kaptak, IFA jelenlétében a 0. és a 14. napon, szubkután, talpba és faroktőbe. Az állatokat a 28. napon áldoztuk fel.

IV.3.2. A kis affinitású FcγRII/III és a CR1/2 receptorokhoz való antigén irányítás hatása a humorális immunválaszra

A kis affinitású FcγRII/III receptorokat a 2.4g2 scFv, míg a CR1/2-t a 7g6 scFv segítségével céloztuk, SA-val illetve msSA-val konjugálva, és a két receptor együttes célzására pedig mindkét scFv-t tartalmazó komplexeket használtunk.

A humorális immunválasz jellemzéséhez az egerek szérum mintáiból meghatároztuk ELISA módszerrel az anti-SA-myc-HH IgG1 és IgG2a ellenanyagszinteket. Az antigénspecifikus IgG2b, illetve IgG3 ellenanyagszint kimutatásához nem találtunk a kereskedelmi forgalomban megbízhatóan működő sztenderdet, az IgM mennyisége pedig alacsonynak bizonyult, és nem volt különbség a kontroll és az irányított antigéneket tartalmazó komplexekkel oltott csoportok értékei között, így azokat nem ismertettük a dolgozatban. Az össz-ellenanyagszintek, valamint az antigénspecifikus ellenanyagszintek változásainak kimutatásához reverz fehérje mikroarray technikát is alkalmaztunk, és vizsgáltuk az antigénre specifikus ellenanyagtermelő sejtek számát is ELISPOT módszerrel.



28. ábra.: Az immunizálás módjának beállításához összehasonlítottuk az egyes SA-scFv (SA) illetve msSA-scFv (msSA) komplexek i.p. és s.c. módon történő beadását követő anti-SA-IgG ellenanyagválaszt. Az sc SA II oltásnál négyszeres antigén dózisokat alkalmaztunk. Az i.p. oltásoknál az s.c. oltások hatékonyabbnak bizonyultak a SA-scFv komplexek esetében, valamint négyszeres antigén dózis (sc SA II) alkalmazása SA-scFv esetében nem javította tovább szignifikánsan az ellenanyag szinteket. A diagramon a csoportok (4 egér/cso.) mediánja látható a min. és max. értékekkel. A csak antigént tartalmazó kontroll csoportokat fekete négyzetek jelölik. RU= relatív egység. A vonalak a csoportok (diagramban), a nyilak az immunizálási módok közötti szignifikáns különbségeket jelzik (diagram alatt), ahol $p < 0,05$, Kruskal-Wallis ANOVA analízissel.

IV.3.2.1. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése ELISA illetve ELISPOT módszerekkel

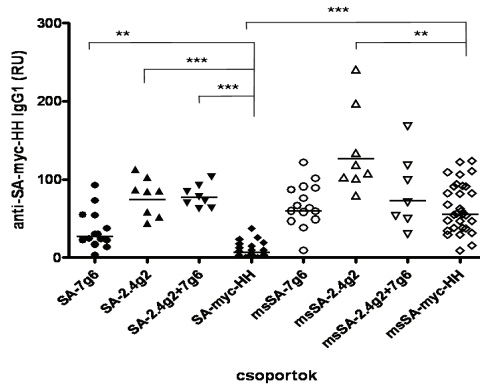
Az ELISA eredmények alapján elmondható, hogy a SA-scFv konjugátumokkal történt immunizáció során mindegyik komplexnél szignifikánsan nőtt az antigénspecifikus IgG1 mennyisége a kontroll csoport értékéhez képest, azaz az irányításnak volt hatása mindegyik scFv esetében (29.A ábra). Az mCR1/2 és az mFcγRII/III receptorokhoz való irányítás egymáshoz viszonyítva nem okozott szignifikáns eltérést az ellenanyagválaszban, mindemellett a FcγRII/III receptorok célzása erőteljesebb IgG1 ellenanyag választ ad, mint a CR1/2 receptoroké. Továbbá elmondható, hogy a CR1/2 és a mFcγRII/III receptorok együttes célzásának hatása nem különbözik számottevően a FcγRII/III célzásának hatásától.

Az msSA-alapú komplexeknél csak az msSA-2.4g2, azaz az antigént az FcγRII/III receptorokhoz irányító komplex bizonyult hatékonynak az antigénspecifikus IgG1 válasz kiváltásában, míg a CR1/2 receptorhoz, illetve az egyidejűleg mindkét receptorhoz irányító komplexek hatása nem különbözött szignifikánsan a kontroll, msSA-myc-HH csoportétól (29.A ábra). Az antigénspecifikus IgG2a mennyisége elhanyagolható volt mind a szolubilis SA-scFv, mind az msSA-scFv komplexeknél, ezért nincs ábrázolva a dolgozatban.

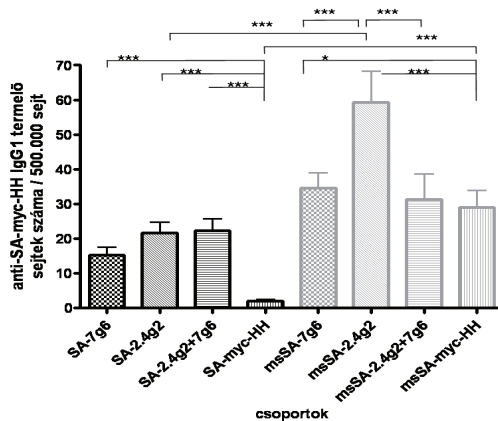
A mikrogyöngyök immunválasz fokozó tulajdonságát alátámasztotta, hogy a mikrogyöngyökhöz konjugált SA-myc-HH antigén szignifikánsan magasabb specifikus IgG1 ellenanyag szintet váltott ki, mint a szolubilis SA-hoz konjugált formája.

Az ELISPOT módszerrel mért antigénspecifikus IgG1 ellenanyagot termelő sejtek számának változása alátámasztotta az ELISA mérés eredményét, azaz az irányított antigének hatékonyabbnak bizonyultak az ellenanyagtermelés növelésében a nem irányíthatóhoz képest, mind a SA, mind az msSA alapú komplexek esetében (29.B ábra). Emellett az FcγRII/III receptorok célzása mikrogyöngy tartalmú komplexekkel szignifikánsan növelte az ellenanyagtermelő sejtek számát a többi msSA tartalmú, illetve az SA-2.4g2 komplex hatásához képest. Az eredmények azt is mutatták, hogy az msSA tartalmú komplexeknél összességében megemelkedett a specifikus ellenanyagtermelő sejtek száma az SA alapúakhoz viszonyítva - a növekedés szignifikánsnak bizonyult a kontroll peptidet és a 2.4g2 scFv-t hordozó komplexeknél -, amely újfent a mikrogyöngyök adjuváns hatására utalt.

A



B



29. ábra: A CR1/2 (7g6), az FcγRII/III (2.4g2) és a receptorok együttes célzásánál (2.4g2+7g6) a humorális immunválasz jellemzésére ELISA és ELISPOT technikát is alkalmaztunk. (A) Az antigénspecifikus IgG1 szinteket ELISA módszerrel SA-myc-HH peptid felületre mért hígított szérumból mértük, anti-egér IgG1-HRP ellenanyag segítségével. RU: relatív egység, a 9E10 anti-myc egér IgG1 ellenanyag koncentrációjához viszonyított IgG1 szintek. Egyedi értékeket ábrázoltunk, a vízszintes vonal a csoportátlag. A statisztikai analízis Kruskal-Wallis ANOVA-val történt. (B) ELISPOT módszerrel SA-myc-HH antigénnel fedett lemezen 5×10^5 nyirokcsomó eredetű sejtől mértük a specifikus ellenanyagot termelőket. Az oszlopok az egyes csoportok geometriai átlagát mutatják, szórással, az eltéréseket χ^2 teszttel elemeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

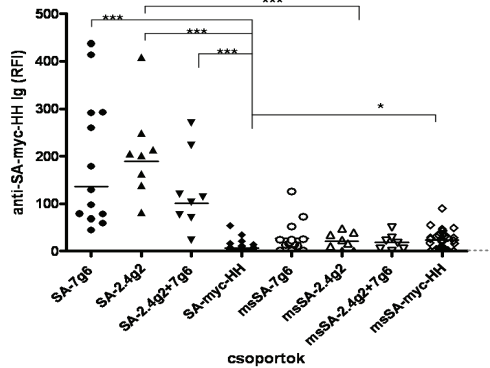
IV.3.2.2. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése reverz array módszerrel

Reverz fehérje mikroarray technikával elemeztük az össz antigénspecifikus Ig és az össz IgG1 szintek változását, mivel az itt megjelenő eltérések is jellemezhetik a humorális immunválaszt, és mert az ELISA eredményekkel összevetve a kiváltott ellenanyagválasz minőségéről többet tudhatunk meg. Az össz antigénspecifikus Ig szintek a SA-scFv-vel kezelt csoportok esetében szignifikánsan magasabbnak bizonyultak, mint a kontroll SA-myc-HH komplexszel kezelt csoport esetében – ez utóbbi a kezeletlen egerekben kimutatható anti-SA-myc-HH ellenanyagok szintjétől alig különbözik -, és emellett magasabbak a msSA alapú komplexekkel immunizált egerekben mért értékeknél (30.A. ábra) is. A msSA-scFv csoportokban a tapasztalt össz anti-SA-myc-HH Ig szint nagyon alacsony, és a csoportok között nem mutatkoztak eltérések. Az össz IgG1 szintet elemezve látható, hogy ez minden csoportnál emelkedett oltást követően a kezeletlen egerekben mérhető képest, de a különböző komplexek hatásaiban nem mérhető eltérés (30.B. ábra). A mikrogöngyök immunválaszt fokozó tulajdonságát szintén megerősítette, hogy a csak antigént hordozó, kontroll csoportok között mind az össz antigénspecifikus Ig, mind az össz IgG1 mennyiség tekintetében szignifikáns eltérés tapasztalható a mikrogöngy tartalmú komplexek javára, az ELISA és az ELISPOT eredményekhez hasonlóan.

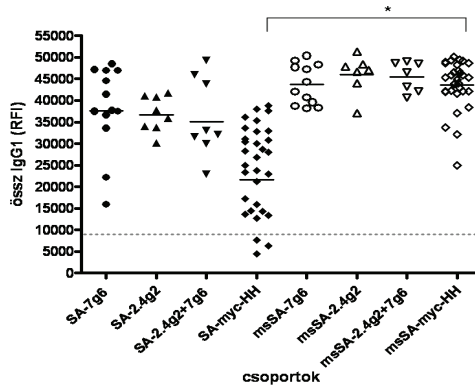
IV.3.3. A CD40 és kis affinitású FcγRII/III receptorokhoz irányított antigén hatása a humorális immunválaszra

A következő *in vivo* kísérletben a modell antigént az FGK scFv által a CD40 receptorhoz, illetve a 2.4g2 scFv által a FcγRII/III receptorokhoz irányítottuk, a receptorokat egyenként és egyszerre is célozva, SA és msSA alapú komplexekkel egyaránt. Az oltási protokoll az előzőekben ismertetettel megegyezett. Az oltásokat követően megvizsgáltuk az aktiválódott sejtek körét áramlási citofluorimetriával, és a kiváltott humorális immunválaszt jellemeztük ELISA, reverz ELISPOT és reverz mikroarray segítségével.

A



B



30. ábra: Az immunizált állatok szérumainak ellenanyagtartalmi vizsgálata reverz array segítségével. A nitrocellulóz membránra kipontozott immunszérumok (A) össz antigénspecifikus Ig mennyiségét SA A488-myc-HH konjugátum, míg (B) össz IgG1 tartalmát anti-egér IgG1-A488 ellenanyag segítségével határoztuk meg. A SA-scFv komplexek magas össz antigénspecifikus Ig szintet váltottak ki, szemben az msSA-scFv komplexekkel. Az össz IgG1 szint pedig az msSA-scFv csoportokban emelkedett meg jobban. A pontok az egyes egerek egyedi adatait mutatják, a fekete vonal a csoportok, a szűrke szaggatott vonal a kezeletlen egerek értékeinek geometriai átlagát jelzi. RFI: relatív fluoreszcens intenzitás. A statisztikai elemzést Kruskal-Wallis ANOVA-val végeztük, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

IV.3.3.1. Az immunizáció hatása az APC-k aktivációjára

MHCII expressziójuk alapján megvizsgáltuk áramlási citofluorimetriával, hogy az immunizálást követően az oltás helyéhez eső legközelebbi nyirokcsomókban mely antigénprezentáló sejtek aktiválódtak leginkább. Az anti-CD45R marker alapján azonosított B-sejteket és a CD11b+ makrofágokat vizsgálva megállapítottuk, hogy a B-sejteken alig, míg a makrofágokon jelentősen megemelkedett az MHCII expressziója, a kezeletlen egerekben mért értékhez képest, ám minden komplexnél hasonló arányban (31. ábra). Nem tapasztaltunk kiugró MHCII növekedést a CD40 célzását megvalósító FGK45 scFv-t tartalmazó csoportokban, bár irodalmi adatok szerint anti-CD40 kezelés hatására az MHCII megjelenése fokozódik az APC-ken, főleg a B-sejteken. Mivel az msSA-scFv és az SA-scFv-vel kezelt csoportok között nem volt különbség, a dolgozatban csak az egyik, a SA-scFv komplexekkel történt oltási kísérlet adatait mutattuk be.

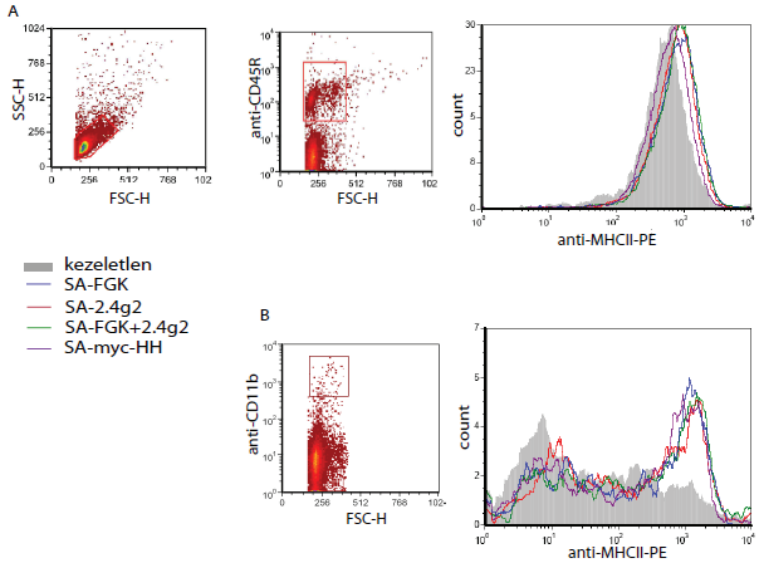
IV.3.3.2. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz jellemzése ELISA módszerrel

Szemikvantitatív ELISA mérésekkel az antigén, azaz a SA, a myc- és a his-tag-re specifikus IgG1 és IgG2a ellenanyag szintek változását elemeztük, összevetve a különbözőképpen irányított, illetve a csak kontroll peptidet - a myc-HH peptid - tartalmazó komplexek hatásait.

Az eredmények szerint a szolubilis SA alapú, SA-scFv komplexek mindegyike a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan több anti-SA-myc-HH IgG1 ellenanyag termelődését váltotta ki, és a különböző scFv-t hordozó komplexekkel immunizált csoportok értékei nem tértek el jelentősen egymástól (32.A. ábra). Az msSA alapú komplexekkel kezelt egerekben szintén emelkedett az anti-SA-myc-HH IgG1 szint, de a csoportok között nem volt eltérés; az msSA-scFv csoportok nem különböztek az msSA-myc-HH kontroll csoporttól sem (32.A. ábra). Ugyanakkor kimutattuk azt is, hogy a mikrogyöngyökhöz kapcsolt antigén (msSA-myc-HH) szignifikánsan magasabb antigénspecifikus IgG1 ellenanyagtermelést indít, mint a szolubilis SA-hez kapcsolt (SA-myc-HH); ezt már a 7g6/2.4g2 scFv tartalmú oltási sorozatban is megfigyelhettük.

Az anti-SA-myc-HH IgG2a ellenanyagválaszt tekintve elmondható, hogy mindegyik SA-scFv kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan több IgG2a termelődött; legnagyobb növekedést a CD40 receptorhoz való irányítás esetén mutattunk ki

(32.B ábra). Ezzel szemben az msSA-scFv komplexek gyenge antigénspecifikus IgG2a ellenanyagválaszt váltottak ki.



31. ábra: Áramlási citofluorimetria segítségével megvizsgáltuk az MHCII expressziójának változását nyirokcsomó eredetű APC-ken, a SA-FGK/2.4g2 komplexekkel való immunizálás után két héttel. Az MHCII expresszió a kezeletlen BALB/c egér eredetű nyirokcsomó sejteken mért értékhez képest (A) a CD45R pozitivitásuk alapján azonosított B-sejteken nem változott, míg (B) a CD11b+ makrofágokon jelentősen megemelkedett, ám a csoportok között nem volt különbség.

IV.3.3.3. Az antigénspecifikus ellenanyagválasz elemzése reverz ELISPOT és reverz mikroarray segítségével

Az antigénspecifikus Ig-t termelő sejtek számát reverz ELISPOT technikával mértük, ahol egy anti-kappa-lánc és anti-lambda-lánc ellenanyaggal fedett lemezekon az összes termelt Ig közül a specifikusakat myc-HH peptiddel kapcsolt SA-HRP reagenssel mutattuk ki (33.A ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a SA-scFv komplexekkel oltott egerekben

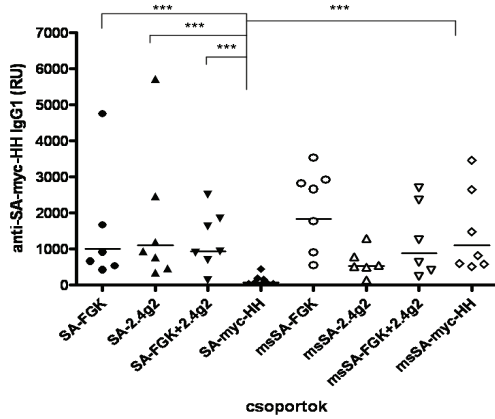
szignifikánsan több ellenanyagtermelő sejt jelent meg, a kontroll SA-myc-HH csoport egereihez képest, valamint egyes esetekben a megfelelő msSA alapú komplexekkel oltottakhoz képest is. Az egyes irányítást tartalmazó csoportok között nem volt különbség.

Az ELISPOT esetében kapott adatok tükröződnek az összes antigénspecifikus Ig-t kimutató reverz mikroarray eredményekben is, ahol az immunizált állatok szérumait nyomtattuk nitrocellulóz membránra, majd a myc-HH peptiddel konjugált, fluoreszcens festékkel jelölt SA-nel detektáltuk a specifikus ellenanyagokat (33.B ábra). A mért fluoreszcencia intenzitások alapján a SA-scFv komplexek hatására szignifikánsan több antigénspecifikus Ig jelent meg, mint a kontroll SA-myc-HH komplex hatására. Az msSA-scFv komplexekkel kezelt egerek szérumában kevés az össz antigénspecifikus Ig mennyisége a reverz array szerint, és egyes SA-scFv komplexekkel kezelt egerekben szignifikánsan magasabb ellenanyag szintet mértünk, mint a mikrogyöngy alapú megfelelőikkel kezeltékben.

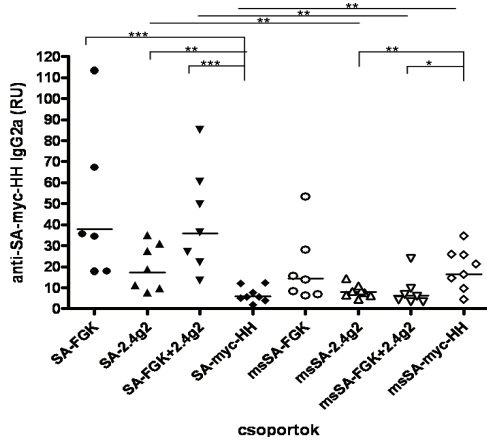
Mindkét módszer azt mutatja, hogy nagy mennyiségű antigénspecifikus ellenanyagok megjelenéséhez egyértelműen a szolubilis SA tartalmú komplexek az alkalmasabbak.

Reverz mikroarray segítségével elemeztük az immunszérumok össz IgG1 és össz IgG2a tartalmát is, mivel kíváncsiak voltunk, hogy az immunizáció megnövelte-e az össz Ig szinteket, mint ahogy azt egy adjuváns anyagtól, pl. a mikrogyöngyöktől, várnánk. Az irodalmi adatok alapján az APC-k CD40 receptorának stimulálása is fokozza az immunválaszt, azaz adjuváns-szerű hatása lehet. A mérés eredményei szerint az össz IgG1 (34. A ábra) és az össz IgG2a szintje (34. B ábra) valóban megemelkedett a legtöbb, mikrogyöngyöt tartalmazó komplexszel való immunizáció során, összehasonlítva az SA-scFv komplexekkel, mely igazolta a mikrogyöngyök már jól ismert adjuváns hatását. Emellett a CD40 célzása, mind az SA, mind az msSA alapú komplexekben, is szignifikánsan növelte az össz IgG2a illetve IgG1 mennyiségét a kontroll komplexek hatásához képest.

A

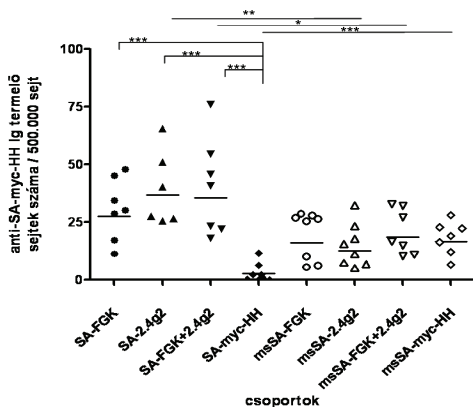


B

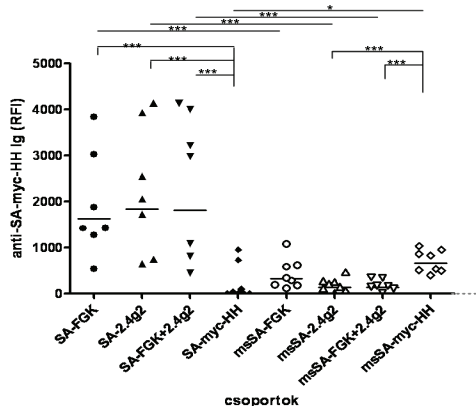


32. ábra: ELISA módszer segítségével jellemeztük az antigénspecifikus ellenanyag szinteket az SA/msSA - FGK45/2.4g2 scFv komplexekkel való immunizálás után. A mérés során SA-myc-HH konjugátummal fedett lemezekon hígítottuk az immunizált egerek savóit, majd (A) az antigénspecifikus IgG1-et, illetve (B) IgG2a-t anti-egér IgG1-HRP vagy anti-egér IgG2a-HRP ellenanyaggal detektáltuk. Az egyedi adatokat ábráztuk a diagramon, a fekete vízszintes vonal a csoportok geometriai átlagát jelöli. RU= anti-myc 9E10 / 9B11 ellenanyag mennyiségére vonatkoztatott relatív egység. A statisztikai elemzést permutációs teszttel végeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

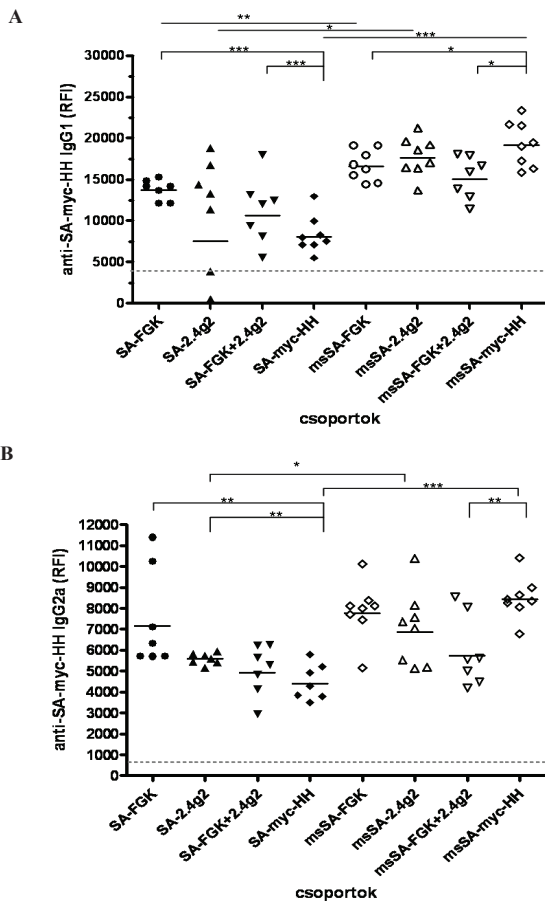
A



B



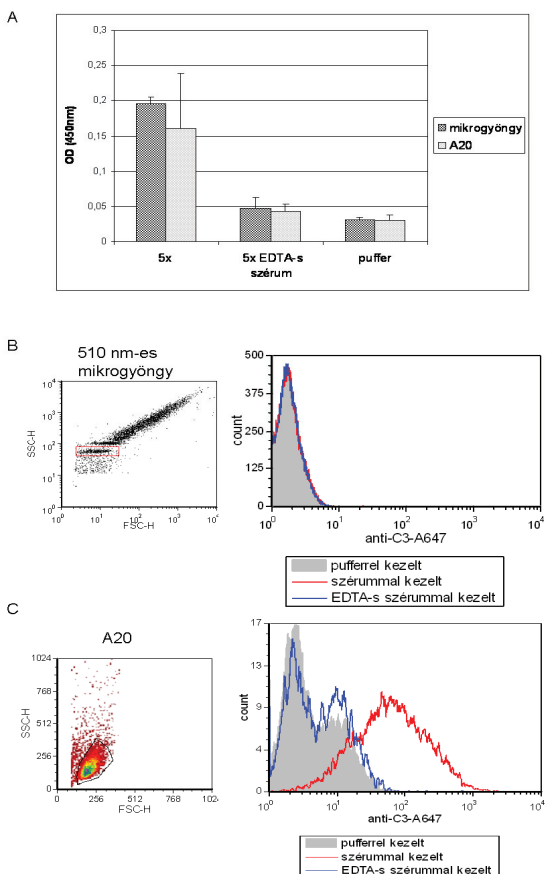
33. ábra: A humorális immunválasz elemzése reverz ELISPOT és az összes antigénspecifikus Ig-t kimutató reverz mikroarray segítségével. (A) Reverz ELISPOT mérésnél az anti- κ/λ lánc ellenanyaggal fedett lemezre kikötődött Ig-k közül a specifikusokat SA-myc-HH HRP reagenssel detektáltuk. (B) Az össz antigénspecifikus Ig szintet kimutató reverz array-nél az immunizált állatok szérumait nyomtattuk nitrocellulóz membránra, majd SA A488- myc-HH peptid konjugátummal detektáltuk a specifikus ellenanyagokat. A pontok az egyes egerek értékei, a fekete vonal a csoportok, a szürke szaggatott vonal a reverz array-nél a kezeletlen egerek geometriai átlagát jelzi. RFI= relatív fluoreszcens intenzitás. A statisztikai elemzést permutációs teszttel végeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



34. ábra: Az immunizált állatok szérumainak össz (A) IgG1 és (B) IgG2a ellenanyag mennyiségét reverz array segítségével vizsgáltuk, ahol a nitrocellulóz membránra kipontozott szérumokban az ellenanyagok mennyiségét anti-egér IgG1/anti-egér IgG2a-HRP ellenanyaggal detektáltuk. Az adatok szerint a mikrogyöngyök jelenléte (msSA csoportok) és a CD40 célzása egyaránt növelte az össz IgG1 és IgG2a mennyiségét. Mindkét görbén a pontok az egyes egerek értékeit, a fekete vonal a csoportok, míg a szürke szaggatott vonal a kezetlen egerek geometriai átlagát jelzi. RFI= relatív fluoreszcens intenzitás. A statisztikai elemzést permutációs teszttel végeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

IV.3.3.4. A mikrogyöngyök képesek kiváltani a komplement fehérjék aktivációját

Mivel az *in vivo* kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy a mikrogyöngyök fokozott ellenanyagtermelést váltottak ki, ám a komplement receptorokhoz való irányítás nem működött, megvizsgáltuk, hogy maguk a mikrogyöngyök, illetve a felszínük, mennyire képesek aktiválni a komplementrendszert. Hiszen elképzelhető, hogy a partikulumok miatt felszabaduló C3b és C3d fragmentumok elfedik a 7g6 scFv kötőhelyét a CR1/2 receptorokon, megakadályozva az antigének komplement receptorokhoz való irányítását. A kísérletben a mikrogyöngyöket ötszörös hígítású normál vagy EDTA-s egérszérummal kezeltük, majd mértük a felszínükön lerakódott C3 fragmentumokat ELISA rendszerben és áramlási citofluoriméteren is mértük. Az EDTA-s szérumokkal kezelt minták negatív kontrollként szolgáltak, ugyanis a komplementaktivációt az EDTA megakadályozza, megköti az ahhoz szükséges ionokat. Az ELISA mérés eredménye szerint a mikrogyöngyök felszínén kimutathatóak a C3 fragmentumok, azaz aktiválták a komplementrendszert, akárcsak a pozitív kontrollként használt A20 sejtek (35. A ábra). Az áramlási citofluorimetria eredménye ennek ellentmond, mert a C3 fragmentumok lerakódása csak az A20 sejteknél mutatható ki (35. C ábra), a mikrogyöngyökökön nem (35. B ábra). Az EDTA-s szérummal kezelt patikulumokon és sejteken viszont nem jelentek meg a C3 fragmentumok egyik módszerrel vizsgálva sem, azaz a rendszer működött. A két módszer különböző eredménye azzal magyarázható, hogy valószínűleg egy-egy mikrogyöngyön csak kevés hasított C3 fehérje lehet, amelyeket a citofluoriméter az egyszerre átmenő kiszámú mintából nem érzékel úgy, mint az ELISA módszer, ahol nagyszámú mikrogyöngy felszínén zajló reakciót detektálunk egyidejűleg. Méréseink alapján tehát kevés C3 fragmentum keletkezhetett az mSA-scFv komplexekkel való oltásnál, amely nem befolyásolhatta jelentősen a 7g6 scFv kötődését a CR1/2 receptorokhoz.



35. ábra: Az 510 nm átmérőjű, sztreptavidinnel fedett mikrogyöngyök komplement aktiváló képességének vizsgálatához (A) ELISA rendszerben mértük a mikrogyöngyökre és a pozitív kontrollként használt A20 B-sejtekre kikötődött C3 fragmentumokat 5x normál, illetve 5x EDTA-s BALB/c eger szérummal történt kezelés után, anti-eger C3-HRP-vel. A diagramon az eredmények geometriai átlagát és szórását mutatja. (B) Ugyanilyen kezeléssel mellett áramlási citofluorimetriával vizsgálva viszont a mikrogyöngyökön nem mutatható ki C3 fragmentum, szemben (C) az A20 sejtekkel.

V. Diszkusszió

Kutatásainkban arra kerestük a választ, hogy elég hatékony-e az egyláncú ellenanyagokkal, mint molekuláris adjuvánsokkal, történő antigén irányítás az antigénspecifikus immunválasz erősítéséhez vagy modulálásához. Munkacsoportunk létrehozott egy olyan egyláncú ellenanyag panelt, amelyekkel az antigéneket az antigénprezetáló sejtekhez, pontosabban azoknak az immunválasz kialakításában és szabályozásában elengedhetetlen receptoraihoz juttathatjuk el, ezáltal befolyásolva az immunválaszt. A célreceptorok között szerepelt az egér Fc γ RII és III, a CR1/2, valamint a CD40.

Az Fc γ RII és III receptorokat a 2.4g2 scFv-vel, a CR1/2-t pedig a 7g6 scFv-vel céloztuk, amelyeket kutatócsoportunk már korábban előállított és jellemzett. A CD40 felismerésére alkalmas FGK scFv-t a jelen munkához kapcsolódva hoztuk létre az agonista anti-CD40 ellenanyagot termelő FGK45.5 hibridómából kiindulva. A VL és VH domének nukleotid szekvenciájának klónozása után, azok összekapcsolásával, előállítottuk az scFv nukleotid szekvenciáját, és a szekvencia helyességét szekvenálással is igazoltuk. Az FGK scFv-t a DNS szintű elkészítése után fehérje formában is létrehoztuk, majd *in vitro* kísérleti körülmények között bizonyítottuk, hogy kompetál az eredeti ellenanyaggal, azaz specifikus az egér CD40 receptorra. Emellett jellemeztük kötődését az irodalom alapján CD40 receptort kifejező sejtekhez, úgy mint a B-sejtekhez, a makrofágokhoz és a dendritikus sejtekhez, valamint ellenőriztük, hogy nem kapcsolódik CD40 negatív sejtpopulációkhoz, mint a T-sejtek vagy a neutrofil granulociták. Az eredmények tükrözték az irodalmi adatokat, azaz az FGK scFv szelektíven kötődött az APC-khez. Az FGK45.5 ellenanyagból egy másik kutatócsoport is készített rekombináns ellenanyagot (169), amelyben a VL és a VH doméneket Ig konstans doménekhez kapcsolták. Ugyanakkor a VL és a VH régió klónozása szűkszavú, és a szekvenciákról sincsen adat. Ez a rekombináns anti-CD40, valamint az eredeti FGK45.5 teljes ellenanyag (164) is, *in vitro* kísérletekben képesek voltak aktiválni a B-sejteket és a DC-ket: többek között a CD80, a CD86 és az MHCII receptorok expressziójának növekedését, és a sejtek proliferációját is kiváltották. Ezzel szemben az általunk létrehozott FGK scFv-vel nem tudtuk kiváltani a B-sejtek osztódását *in vitro* körülmények között, tetramer formában sem, ami jelzi, hogy valószínűleg ehhez a funkcióhoz az Fc-részek jelenléte és ezáltal az FcR receptorok keresztkötése is szükséges. Mindemellett vizsgálataink alapján az általunk előállított FGK scFv alkalmasnak bizonyult antigének CD40 receptorhoz való eljuttatására.

Az egyláncú ellenanyagokat oligomerizáltuk a nagyobb számú receptor keresztkötés elérése érdekében a biotin-sztreptavidin rendszert használva: szolubilis SA-nel vagy SA-nel fedett mikrogyöngyökkel (msSA) konjugáltuk a monobiotinilált scFv-ket. Az így kialakult komplexeket használtuk az *in vivo* kísérletekben az APC-k célzására, modell antigénként a minden komplexben jelenlévő sztreptavidin és az scFv-hez fűzött myc-tag és his-tag szolgáltak. A komplexek kialakításakor ellenőriztük, hogy a biotinizáció, illetve a sztreptavidinnel való konjugáció nem zavarja az ellenanyagokhoz képest kevésbé stabil scFv kötődését a célreceptorához. Az SA-scFv komplexeknél mind a 7g6, a 2.4g2 és az FGK scFv esetében igazoltuk az oligomer scFv-k változatlan kötődését a célreceptort kifejező A20 hibridómához, valamint a nyirokcsomó eredetű B-sejtekhez és makrofágokhoz is, áramlási citofluorimetriás mérés során. Az msSA-scFv komplexek kötődése viszont eltért a szabad scFv-k kötődésétől.

Az 510 nm átmérőjű SA-nel fedett mikrogyöngy alkalmazásával a célzó komplexekben arra kerestük a választ, hogy az ismert adjuváns hatású mikropartikulumok az scFv irányítás hatását is képesek-e fokozni, pl. a valenciájuk további növelésével. A mikrogyöngyök adjuváns hatásának alapja, hogy a virális vagy bakteriális mérettartományba esve a DC-k illetve a makrofágok könnyen felveszik és feldolgozzák őket, a hozzájuk kapcsolt antigénnel együtt. A P388 makrofág sejtvonalon végzett konfokális mikroszkópiás mérésünk megerősítette, hogy az 510 nm átmérőjű msSA partikulumokat a makrofágok könnyen felveszik. Ellenőriztük az msSA-scFv komplexek kötődési képességeit nyirokcsomó eredetű primer sejteken, ahol kimutattuk, hogy a mikrogyöngyök nem zavarták az scFv-ket a célreceptorok felismerésében B-sejteken, habár kevesebb B-sejt jelölődött, mint ha a megfelelő szabad SA-scFv komplexszel kezeltük volna őket. Ennek oka a mikrogyöngy szuszpenzió inhomogenitása lehet, mivel a gyöngyök aggregációra hajlamosak, ami kivédhető a minták alapos szonikálásával a mintaelőkészítés során. Az msSA-scFv komplexek kötődtek a nyirokcsomó eredetű makrofágokhoz is, ám kapcsolódásuk függetlennek mutatkozott az scFv-k specificitásától; a minden komplexnél egyforma mértékű kötődés a gyöngyök szelekció nélküli, méret alapú felvételét tükrözte. A komplexek kötődésének elemzése kimutatta, hogy az msSA-scFv komplexek, csakúgy mint az SA-scFv komplexek, képesek voltak az antigének eljuttatására a B-sejtekhez és a makrofágokhoz is *in vitro* kísérleti körülmények között, ugyanakkor a makrofágok aktivációja anélkül történik meg, hogy a scFv-k nagyszámban kapcsolódhatnának a célreceptorukhoz. Az msSA-scFv komplexeknek vizsgáltuk az *in vivo* lokalizációjukat is, és kimutattuk, hogy szubkután oltást követően a mikrogyöngyök elérik a környéki nyirokcsomókat, ahol elsősorban a szinuszoid hálózatban –

főként a szubkapszuláris szinusz területén –helyezkednek el, és csak elenyésző százalékuk jelent meg sejthez kötötten. Az egyes csoportok között nem volt különbség a lokalizációban, amely újfent jelezte, hogy nem az irányító scFv-k alapján történik a gyöngyök felvétele.

Az oltások során kimutattuk azt is, hogy az oltóanyag hatására a környéki nyirokcsomókban lévő makrofágokon az MHCII expresszió megnövekedett, függetlenül attól, hogy szolubilis vagy msSA tartalmú komplexekkel oltottunk, míg a B-sejteken változatlan maradt, azaz a makrofágok jobban aktiválódtak az immunizáció során. Ez utal arra, hogy az ellenanyagtermelés alakulását, a létrejövő izotípus megoszlást közvetetten, az aktivált makrofágok által kialakított citokin és kemokin környezeten keresztül szabályozhatják a komplexek, nem pedig a B-sejtek közvetlen aktiválásával. Az msSA komplexekkel kezelt csoportokban az oltóanyag mellett a beadott mikrogyöngyök is hozzájárulhattak a makrofágok aktiválásához, hiszen a vizsgálataink is kimutatták, hogy a makrofágok könnyen felveszik őket. A makrofágok mellett valószínűleg a DC-k is rész vesznek a citokin környezet kialakításában, mint a leghatékonyabb antigénprezentáló sejtek, és ők is képesek egy 510 nm átmérőjű mikropartikulum felvételére (18), ezt azonban nem állt módunkban vizsgálni.

Miután bizonyítottuk, hogy az SA-scFv és az msSA-scFv komplexek képesek az antigént eljuttatni a B-sejtekhez és a makrofágokhoz, *in vivo* kísérletekben megvizsgáltuk a humorális immunválasz változását az FcγRII/III, a CR1/2 és a CD40 egyenkénti, illetve kombinált célzásának esetén, szolubilis és partikuláris komplexekkel egyaránt. A szolubilis SA alapú komplexekkel való immunizálás eredményeit értékelve elmondhatjuk, jól irányíthatónak bizonyultak az scFv-k által az *in vivo* kísérletek során: az SA-7g6, a SA-2.4g2 és a SA-FGK scFv kezelt egerekben is szignifikánsan magasabb IgG1 ellenanyag szintet mérünk, mint a csak az antigént tartalmazó SA-myc-HH komplexszel kezeltékben. Az FcγRII/III célzása bizonyult a leghatékonyabbnak az antigénspecifikus IgG1 szint fokozásában, összehasonlítva a CR1/2, vagy a CR1/2 és a FcγRII/III kettős célzásával. Hasonlóan magas IgG1 termelést váltott ki az antigének CD40-hez való irányítása is, mint a FcγRII/III célzása, ám ennek mértéke a CD40 és FcγRII/III receptorok együttes célzásával tovább nem fokozódott. Az antigénspecifikus IgG1 termelődése mellett az IgG2a ellenanyagok mennyisége is növekedett a CD40 receptort vagy a FcγRII/III receptorokat célzó komplexek esetében a kontrol csoport értékeihez képest, míg a CR1/2 célzása nem indukálta jelentős mennyiségű IgG2a megjelenését.

Az antigének irányítása SA-2.4g2 scFv komplexekkel annak ellenére bizonyult hatékonynak az antigénspecifikus IgG1 és IgG2a ellenanyagtermelés fokozásában, hogy a gátló FcγRIIB-hez is kapcsolódhat a 2.4g2 scFv. Hasonlóan eredményünkhöz, Angyal A. és

munkacsoportja 2.4g2 scFv-avidin-FITC komplexekkel immunizált egerekben magas avidin-FITC-specifikus IgG ellenanyag szintet mutatott ki (88). Ugyancsak a humorális immunválasz fokozódását tapasztalta Getahun és munkacsoportja is IgG2a-antigén konjugátumok oltása során, ahol az IgG2a ellenanyag szintén felismerésre kerülhet az aktiváló és a gátló FcγR-ok által is (84). Kimutatták azt is, hogy az antigénspecifikus ellenanyag szint emelkedése FcγR lánc hiányos egereknél nem történik meg az IgG2a-antigén konjugátum hatására, ami jelzi, hogy az aktiváló receptorokkal való kapcsolódás az elsődleges a fokozott ellenanyagtermelés kialakításában olyan komplexeknél, amelyek aktiváló és gátló FcγR-hoz is tudnak kapcsolódni. A SA-2.4g2 komplexek is valószínűleg nagyszámban kapcsolódtak aktiváló FcγR receptorokhoz, valószínűleg makrofágokon és DC-ken, az oltást követően. Mivel az aktiváló FcγR receptorok keresztikötésére induló érési folyamatokat a gátló FcγRIIB stimulálása nem meggátolja a DC-k felszínén, hanem csak finoman szabályozza, a túlzott aktivációt elkerülendő (170;171), így azért a DC-k, és esetleg a makrofágok, aktiválódhattak, és olyan citokin környezet jöhetett létre, amely a B-sejtek osztódását és ellenanyagtermelését elősegítette.

Az FcγRII/III és a CR1/2 együttes célzása nem fokozta tovább az FcγRII/III célzásánál tapasztalt ellenanyagválaszt, a két receptor nem működik szinergisztikusan. Régóta kérdés, hogy az immunkomplexek által mediált folyamatokban az ellenanyagok mellett az aktivált komplement fragmentumok jelenléte vajon mennyire nélkülözhetetlen a humorális immunválasz növeléséhez. A komplement fragmentumok jelentősége mellett szól az a régóta ismert tény, hogy az IgM és egyes IgG ellenanyagok is képesek a komplement fehérjék nagyfokú aktivációjára, és minél jobb komplement aktiváló egy ellenanyag, annál erősebb az általuk kiváltott ellenanyagválasz (92). Kimutatták, hogy egerekben IgG3-antigén konjugátumokkal való oltás során a komplementrendszer hiánya gátolja a hatékony antigén elleni humorális immunválasz kialakulását (92). Másfelől viszont bizonyították, hogy CR1/2 hiányos egerekben is kialakulhat IgG-antigén fúziós fehérje ellen ellenanyagtermelés (93), vagy IgG1-antigén és IgG2a-antigén komplexek ellen nem indukálódik ellenanyag válasz ha nincs FcγR lánc, de a komplementrendszer ép (89). Eredményeink is azt jelzik, hogy az immunkomplex által kiváltott ellenanyagtermelésben az FcγRII/III-nek nagyobb szerepe lehet, mint a CR1/2-nek. Az antigén irányítása a CR1/2 receptorhoz nem váltott ki jelentősebb ellenanyagtermelést, sem az SA-7g6 scFv, sem pedig az msSA-7g6 scFv komplexeknél. Az utóbbi esetben kimutattuk azt is, hogy a mikrogyöngyök aktiválják a komplementrendszert, ám csak kis mennyiségű C3 fragmentum szabadul fel, amely nem akadályozhatja jelentős mértékben – pl. a CR1/2 receptorok elfedésével – a 7g6 scFv kötődését a CR1/2

receptorokhoz. Heyman B és munkatársai vizsgálatai alapján a CR1/2 szerepe az IC indukált folyamatokban inkább a memória válasz kialakításában van, mintsem az ellenanyagtermelés kiváltásában (92).

Az antigének CD40 receptorhoz való irányítása során tapasztalt fokozott antigénspecifikus IgG1 és IgG2a ellenanyagválasz bizonyította, hogy a CD40 receptor FGK scFv általi stimulációja hasonlóan hatékony lehet, mint a teljes anti-CD40 ellenanyagokkal végzett stimuláció. Érdemes megjegyezni, hogy az FGK scFv tartalmú komplexekkel kezelt egerekben jelent meg a legnagyobb antigénspecifikus IgG2a ellenanyagtermelés az eredmények alapján, amely összhangban van Barr TA és munkacsoportja által végzett kísérletek eredményével. Ebben a kutatásban IgG2a izotípusú anti-CD40 ellenanyaghoz kapcsolt ovalbuminnal vagy *herpes simplex* vírus D glikoproteinjével (HSVgD) immunizáltak egereket, és szignifikánsan magasabb OVA illetve HSVgD antigén ellenes IgG2a ellenanyag megjelenését tapasztalták, az izotípus kontrollt tartalmazó konjugátummal vagy a szabad antigénnel immunizált állatokban mért ellenanyag szintekhez képest (120). A magas IgG2a termelődés jellemzően a T-sejtektől függő immunválasz sajátja egerekben, valamint a T-sejtes válasz Th1 irányú eltolódását is jelzi (172;173).

Az antigének Fc γ RII/III és CD40 receptorokhoz történő egyidejű irányítása eredményeink szerint nem fokozta tovább az ellenanyagtermelést a CD40 vagy az Fc γ RII/III receptorok egyedi célzásakor kiváltott igG1 és IgG2a szintekhez képest, azaz ezen receptorok között sem mutatható ki szinergizmus az általunk alkalmazott rendszerben.

Az SA-scFv komplexekkel kezelt egerekben a reverz mikroarray segítségével detektált össz IgG1 és össz IgG2a szintek is igazolták az scFv-k általi antigén irányítás hatékonyságát, és megoszlásuk hasonlóan bizonyult az ELISA módszerrel mért antigénspecifikus IgG1 és IgG2a megoszlásához.

Az msSA-scFv komplexekkel végzett antigén irányításkor szintén megnövekedett az antigénspecifikus IgG1 ellenanyagok szintje ELISA módszerrel mérve, viszont IgG2a ellenanyagok megjelenését nem tapasztaltuk. Emellett antigénspecifikus IgG3 ellenanyagválasz kialakulását is detektáltuk az msSA- 7g6/2.4g2 scFv tartalmú komplexekkel végzett kísérletben, amelyet a dolgozatban nem közöltünk a megfelelő standard hiányában. Az ELISA mérések eredménye kimutatta azt is, hogy a csoportok között legtöbbször nincs számottevő különbség az ellenanyagválaszban; a csak antigént tartalmazó kontroll csoport hasonlóan magas ellenanyagtermelést váltott ki, mint az irányított komplexek, azaz az scFv-k általi irányításnak nem volt hatása a mikrogyöngyök mellett, in vivo körülmények között sem. A csak antigén tartalmazó komplexeknél a mikrogyöngy alapúak szignifikánsan magasabb

antigénspecifikus ellennanyagválaszt okoztak, mint a szolubilis SA alapúak, amely alátámasztotta a mikrogyöngyök igazolt adjuváns hatását. Az msSA-scFv komplexek hatásának reverz array alapú vizsgálatánál tapasztaltuk, hogy nagyobb mennyiségű össz IgG1 illetve össz IgG2a jelent meg az immunizálás után, mint az SA-scFv komplexekkel való oltást követően, ugyanakkor az antigénspecifikus Ig szintek alacsonyabbnak bizonyultak. Pedig az ELISA adatok szerint az msSA-scFv komplexek oltása közel hasonló mennyiségű antigénspecifikus IgG1 ellenanyag megjelenését váltotta ki, mint a SA-scFv komplexek oltása. Ennek az ellentmondásnak az oka feltételezésünk szerint az, hogy a mikrogyöngyök, az általános immunválasz fokozó hatásuknak megfelelően, nagyobb mennyiségű, de kisebb arányban antigénspecifikus, és összességében alacsonyabb affinitású ellenanyagok megjelenését váltották ki, mint a SA alapú komplexek, és a reverz mikroarray adataiban ez az affinitásbeli eltérés jobban megjelenik, mint az ELISA mérés adataiban. Az össz Ig emelkedés szintén megerősíti, hogy a mikrogyöngyök adjuváns hatással bírnak. A fokozott össz Ig termelés mellett a kevesebb antigénspecifikus ellenanyag, valamint az IgG3 ellenanyagok megjelenése T-independens immunválasz kialakulását jelzi, amelyet alátámaszt az is, hogy a mikrogyöngyök azonos, ismétlődő epitópokban gazdag felszíne a TI antigénekre is jellemző.

Megvizsgáltuk az ellenanyagtermelő sejtek számának változását is az immunizáció hatására ELISPOT módszerrel, amely mind a szolubilis SA-scFv, mind a partikuláris msSA-scFv komplexekkel kezelt egerekben követte az ellenanyagtermelés változását; a magasabb ellenanyagszinteket mutató kezelt csoportokban több ellenanyagtermelő sejtet detektáltunk.

A különböző receptorok célzásának immunválaszt befolyásoló hatásainál a humorális immunválasz elemzésére fókuszáltunk, ugyanakkor számos publikáció bizonyítja a celluláris immunválasz módosítását, erősítését az FcγRII/III, a CR1/2 és a CD40 célzásánál is. Az in vivo kísérletek során vizsgáltuk az immunizált egerek környéki nyirokcsomóiból származó T-sejtek antigén általi reaktivációját is sztreptavidinnel konjugált myc- és his-tag peptid komplexekkel, ám nem sikerült a specifikus T-sejtek proliferációját elérni. Ennek magyarázata lehet az, hogy a sztreptavidin gyenge T-sejt epitópokkal rendelkezik, így kevés specifikus T-sejt klón keletkezhetett az immunizáció során (a myc-tag és a his-tag elsősorban B-sejt epitópok). Erre vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésre az irodalomban, az viszont ismert, hogy a sztreptavidin kevésbé immunogén a hasonló szerkezetű, méretű és funkciójú avidinhez képest, pl. mert cukoroldalláncokat nem tartalmaz (174). A kevés specifikus T-sejt keletkezésének ellentmond viszont az FGK scFv tartalmú komplexekkel való oltás során megjelenő nagy mennyiségű IgG2a, amely izotípus jellemzően T-sejtektől függő humorális válasz sajátossága.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy az *in vitro* és az *in vivo* kísérletek alapján az scFv-k képesek a szolubilis komplexek hatékony irányítására. Az FGK scFv és a 2.4g2 scFv fokozták a hozzájuk kapcsolt antigének immunogenitását, és alkalmasak lehetnek humorális immunválasz finomszabályozására egy alegység vakcina elemeként is. Ugyanakkor az scFv-k nem képesek az 510 nm-es mikrogöngyök irányítására, így a mikrogöngyökkel az scFv irányította célzó komplexek hatékonysága nem fokozható. Mindemellett a mikrogöngyök humorális immunválaszt erősítő adjuváns hatását a kísérleteink is alátámasztották.

VI. Összefoglalás

A jelenlegi irányvonal a vakcinák fejlesztésében a sejtmentes, a kórokozók antigénjeit rekombináns formában tartalmazó oltóanyagok előállítására, amelyekhez a rekombináns fehérjék alacsony immunogenitása miatt szükséges adjuváns anyagok hozzáadása is. Napjainkban erősen kutatott terület a molekuláris adjuvánsok (citokinek, Toll-szerű receptorok ligandumai, agonista ellenanyagok) alkalmazhatósága az oltóanyagokban, mivel az általuk véghezvitt célzott sejtaktiváció során az immunválasz mellékreakciók nélkül fokozható. Munkánk célja olyan új, rekombináns egyláncú ellenanyagokon (scFv) alapuló, moduláris komplexek fejlesztése volt, amely fokozza a kapcsolt antigének immunogenitását az antigén prezetáló sejtek (APC) antigénfelvívó receptoraihoz való eljuttatásukkal, és/vagy az APC-k egyidejű stimulációjával.

A kísérleteinkben alkalmaztuk a 7g6 scFv-t a mCR1/2 célzására, a 2.4g2 scFv-t az mFcγRII/III célzására, valamint az FGK scFv-t az mCD40 célzására. Ez utóbbit az eredeti ellenanyagot termelő hibridóma sejtekből géntechnológia segítségével állítottuk elő, és bizonyítottuk specifikus kötődését a CD40 receptorhoz. Az scFv-ket monobiotinilálásuk után sztreptavidinnel vagy sztreptavidinnel fedett mikrogyöngyökkel konjugáltuk, egyedileg illetve egymással is kombinálva, majd az így kialakított célzó komplexekről *in vitro*, illetve *in vivo* kísérleti körülmények között is igazoltuk, hogy képesek eljuttatni a modell antigéneket - a sztreptavidint és az scFv-khez fuzionált myc-tag és his-tag-eket - az APC-khez. A szolubilis komplexek az *in vivo* kísérletekben hatékonyan növelték az antigénspecifikus ellenanyagtermelést a kontroll, csak antigént tartalmazó komplexek hatásához képest az mFcγRII/III, valamint az mCD40 célzása során; utóbbi esetben a magasabb, specifikus IgG2a termelődés az immunválasz Th1 irányú polarizációját is jelezte. A két említett receptor egyidejű, kombinált célzása nem vezetett a humorális immunválasz további erősödéséhez, illetve az antigének mCR1/2 receptorhoz való irányítása sem emelte az ellenanyagválaszt. A szolubilis komplexekkel szemben a partikuláris természetűek csak általános adjuváns hatással bírtak, a kapcsolt antigén elleni immunválaszt nem erősítették.

Eredményeink alapján az mFcγRII/III illetve az mCD40 scFv-k általi célzása hatékonyan erősíti, illetve modulálja az antigénspecifikus humorális immunválaszt, így ez a stratégia alkalmazható lehet az immunválasz fokozására a rekombináns oltóanyagok fejlesztése során.

VII. Summary

Modern vaccine development focuses on the application of recombinant antigens in vaccines instead of using whole, fragmented or attenuated pathogens, because of their better safety. At the same time recombinant antigen-based vaccines proved to be less immunogenic compared to traditional vaccines and require adjuvants to induce and maintain protective antibody levels. Molecular adjuvants, such as cytokines, ligands of Toll-like receptors or agonistic antibodies against APC, are able to induce local yet effective immune response without side effects due to their specific receptor or cell type targeting capability. The aim of our work was to achieve scFv-mediated antigen targeting to relevant receptors on APC involved in antigen uptake or in T-cell costimulation, and thus enhance the immunogenicity of antigen.

We studied the effect of antigen targeting to mCR1/2 using 7g6 scFv, to mFcγRII/III using 2.4g2 scFv, and to mCD40 using FGK scFv. The latter was generated from hybridomas using gene technologies and its specificity for mCD40 was verified. The scFvs were monobiotinylated by BirA enzyme, and conjugated individually or in combination with streptavidin (SA) or with streptavidin-coated microspheres; complexes formed this way were used to target APCs. SA and the Myc- and His-tag peptide fused to scFvs served as model antigens in the experiments. We demonstrated *in vitro* and *in vivo* that scFvs were capable to deliver model antigens to targeted receptors. Moreover, soluble SA-based complexes, which targeted mFcγRII/III or mCD40, induced significant antigen specific antibody response *in vivo* compared to the control complex containing antigens alone. When targeting antigen to mCD40 increased antigen specific IgG2a production was detected, indicating a Th1 biased immune response. The combined targeting of mFcγRII/III and mCD40 could not further enhance the immune response, and targeting mCR1/2 also failed to induce more elevated antibody response. The microsphere-based targeting complexes induced an overall increase in antibody level, but did not enhance specific humoral immunity.

Our study has shown that targeting antigen to mFcγRII/III or to mCD40 by scFvs is capable to enhance and modulate the antigen specific humoral immune response. Thus, these targeting strategies could be useful to increase immunogenicity of antigens in recombinant subunit vaccines.

VIII. Irodalomjegyzék

- 1 Bachmann, M. F. and Jennings, G. T. 2010. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 10:787-796.
- 2 Wilson-Welder, J. H., Torres, M. P., Kipper, M. J., Mallapragada, S. K., Wannemuehler, M. J., and Narasimhan, B. 2009. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *J. Pharm. Sci.* 98:1278-1316.
- 3 Donnelly, S., Loscher, C. E., Lynch, M. A., and Mills, K. H. 2001. Whole-cell but not acellular pertussis vaccines induce convulsive activity in mice: evidence of a role for toxin-induced interleukin-1beta in a new murine model for analysis of neuronal side effects of vaccination. *Infect. Immun.* 69:4217-4223.
- 4 Piyasirisilp, S. and Hemachudha, T. 2002. Neurological adverse events associated with vaccination. *Curr. Opin. Neurol.* 15:333-338.
- 5 Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., and Friede, M. 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 30:23-32.
- 6 Merser, C., Sinay, P., and Adam, A. 1975. Total synthesis and adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66:1316-1322.
- 7 Singh, M., Ugozzoli, M., Kazzaz, J., Chesko, J., Soenawan, E., Mannucci, D., Titta, F., Contorni, M., Volpini, G., Del, G. G., and O'Hagan, D. T. 2006. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine* 24:1680-1686.
- 8 Lindblad, E. B. 2004. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 22:3658-3668.
- 9 Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., and Flavell, R. A. 2008. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453:1122-1126.
- 10 Kool, M., Petrilli, V., De, S. T., Rolaz, A., Hammad, H., van, N. M., Bergen, I. M., Castillo, R., Lambrecht, B. N., and Tschopp, J. 2008. Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* 181:3755-3759.
- 11 Ott, G., Barchfeld, G. L., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., van, H. P., and Van, N. G. 1995. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharm. Biotechnol.* 6:277-296.
- 12 Tritto, E., Mosca, F., and De, G. E. 2009. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27:3331-3334.
- 13 Kensil, C. R. and Kammer, R. 1998. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 7:1475-1482.

- 14 Xiang, S. D., Scholzen, A., Minigo, G., David, C., Apostolopoulos, V., Mottram, P. L., and Plebanski, M. 2006. Pathogen recognition and development of particulate vaccines: does size matter? *Methods* 40:1-9.
- 15 Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J. C., Xiang, S. D., Mottram, P., and Plebanski, M. 2004. Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* 82:506-516.
- 16 Reddy, S. T., Swartz, M. A., and Hubbell, J. A. 2006. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends Immunol.* 27:573-579.
- 17 Fifis, T., Gamvrellis, A., Crimeen-Irwin, B., Pietersz, G. A., Li, J., Mottram, P. L., McKenzie, I. F., and Plebanski, M. 2004. Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J. Immunol.* 173:3148-3154.
- 18 Manolova, V., Flace, A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., and Bachmann, M. F. 2008. Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur. J. Immunol.* 38:1404-1413.
- 19 Kim, J. J., Simbiri, K. A., Sin, J. I., Dang, K., Oh, J., Dentchev, T., Lee, D., Nottingham, L. K., Chalian, A. A., McCallus, D., Ciccarelli, R., Agadjanyan, M. G., and Weiner, D. B. 1999. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:77-84.
- 20 Reichardt, P., Dornbach, B., and Gunzer, M. 2010. APC, T cells, and the immune synapse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 340:229-249.
- 21 Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I., and Verthelyi, D. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* 199:201-216.
- 22 Baldrige, J. R., McGowan, P., Evans, J. T., Cluff, C., Mossman, S., Johnson, D., and Persing, D. 2004. Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4:1129-1138.
- 23 Bansal, A., Paliwal, P. K., Sagi, S. S., and Sairam, M. 2010. Effect of adjuvants on immune response and protective immunity elicited by recombinant Hsp60 (GroEL) of *Salmonella typhi* against *S. typhi* infection. *Mol. Cell Biochem.* 337:213-221.
- 24 Carayanniotis, G. and Barber, B. H. 1987. Adjuvant-free IgG responses induced with antigen coupled to antibodies against class II MHC. *Nature* 327:59-61.
- 25 Estrada, A., McDermott, M. R., Underdown, B. J., and Snider, D. P. 1995. Intestinal immunization of mice with antigen conjugated to anti-MHC class II antibodies. *Vaccine* 13:901-907.
- 26 Barr, T. A., Carlring, J., and Heath, A. W. 2006. Co-stimulatory agonists as immunological adjuvants. *Vaccine* 24:3399-3407.
- 27 Bracci, L., La, S., V, Belardelli, F., and Proietti, E. 2008. Type I interferons as vaccine adjuvants against infectious diseases and cancer. *Expert. Rev. Vaccines.* 7:373-381.

- 28 Grivennikov, S. I. and Karin, M. 2011. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann. Rheum. Dis.* 70 Suppl 1:i104-i108.
- 29 Roozendaal, R. and Carroll, M. C. 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol. Rev.* 219:157-166.
- 30 Kaya, Z., Tretter, T., Schlichting, J., Leuschner, F., Afanasyeva, M., Katus, H. A., and Rose, N. R. 2005. Complement receptors regulate lipopolysaccharide-induced T-cell stimulation. *Immunology* 114:493-498.
- 31 Molnar, E., Prechl, J., and Erdei, A. 2008. Novel roles for murine complement receptors type 1 and 2 II. Expression and function of CR1/2 on murine mesenteric lymph node T cells. *Immunol. Lett.* 116:163-167.
- 32 Carroll, M. C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* 5:981-986.
- 33 Molina, H., Kinoshita, T., Webster, C. B., and Holers, V. M. 1994. Analysis of C3b/C3d binding sites and factor I cofactor regions within mouse complement receptors 1 and 2. *J. Immunol.* 153:789-795.
- 34 Weis, J. J., Tedder, T. F., and Fearon, D. T. 1984. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81:881-885.
- 35 Kurtz, C. B., O'Toole, E., Christensen, S. M., and Weis, J. H. 1990. The murine complement receptor gene family. IV. Alternative splicing of Cr2 gene transcripts predicts two distinct gene products that share homologous domains with both human CR2 and CR1. *J. Immunol.* 144:3581-3591.
- 36 Jacobson, A. C. and Weis, J. H. 2008. Comparative functional evolution of human and mouse CR1 and CR2. *J. Immunol.* 181:2953-2959.
- 37 Prechl, J. and Erdei, A. 2000. Immunomodulatory functions of murine CR1/2. *Immunopharmacology* 49:117-124.
- 38 Pramoongago, P., Takeda, J., Kim, Y. U., Inoue, K., and Kinoshita, T. 1993. Ligand specificities of mouse complement receptor types 1 (CR1) and 2 (CR2) purified from spleen cells. *Int. Immunol.* 5:337-343.
- 39 Kinoshita, T., Thyphronitis, G., Tsokos, G. C., Finkelman, F. D., Hong, K., Sakai, H., and Inoue, K. 1990. Characterization of murine complement receptor type 2 and its immunological cross-reactivity with type 1 receptor. *Int. Immunol.* 2:651-659.
- 40 Krop, I., Shaffer, A. L., Fearon, D. T., and Schlissel, M. S. 1996. The signaling activity of murine CD19 is regulated during cell development. *J. Immunol.* 157:48-56.
- 41 Carter, R. H. and Fearon, D. T. 1992. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256:105-107.

- 42 Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., and Fearon, D. T. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271:348-350.
- 43 Phan, T. G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J. G. 2007. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. *Nat. Immunol.* 8:992-1000.
- 44 Fang, Y., Xu, C., Fu, Y. X., Holers, V. M., and Molina, H. 1998. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J. Immunol.* 160:5273-5279.
- 45 Prodeus, A. P., Goerg, S., Shen, L. M., Pozdnyakova, O. O., Chu, L., Alicot, E. M., Goodnow, C. C., and Carroll, M. C. 1998. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*. 9:721-731.
- 46 Ahearn, J. M., Fischer, M. B., Croix, D., Goerg, S., Ma, M., Xia, J., Zhou, X., Howard, R. G., Rothstein, T. L., and Carroll, M. C. 1996. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*. 4:251-262.
- 47 Fischer, M. B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A. P., Goodnow, C. C., Kelsoe, G., and Carroll, M. C. 1998. Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* 280:582-585.
- 48 Molina, H., Holers, V. M., Li, B., Fung, Y., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W., and Chaplin, D. D. 1996. Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:3357-3361.
- 49 Zipfel, P. F. and Skerka, C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9:729-740.
- 50 Green, T. D., Newton, B. R., Rota, P. A., Xu, Y., Robinson, H. L., and Ross, T. M. 2001. C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine* 20:242-248.
- 51 Ross, T. M., Xu, Y., Bright, R. A., and Robinson, H. L. 2000. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat. Immunol.* 1:127-131.
- 52 Gor, D. O., Ding, X., Li, Q., and Greenspan, N. S. 2006. Genetic fusion of three tandem copies of murine C3d sequences to diphtheria toxin fragment B elicits a decreased fragment B-specific antibody response. *Immunol. Lett.* 102:38-49.
- 53 Lee, Y., Haas, K. M., Gor, D. O., Ding, X., Karp, D. R., Greenspan, N. S., Poe, J. C., and Tedder, T. F. 2005. Complement component C3d-antigen complexes can either augment or inhibit B lymphocyte activation and humoral immunity in mice depending on the degree of CD21/CD19 complex engagement. *J. Immunol.* 175:8011-8023.
- 54 Haas, K. M., Toapanta, F. R., Oliver, J. A., Poe, J. C., Weis, J. H., Karp, D. R., Bower, J. F., Ross, T. M., and Tedder, T. F. 2004. Cutting edge: C3d functions as a molecular adjuvant in the absence of CD21/35 expression. *J. Immunol.* 172:5833-5837.

- 55 Kinoshita, T., Takeda, J., Hong, K., Kozono, H., Sakai, H., and Inoue, K. 1988. Monoclonal antibodies to mouse complement receptor type 1 (CR1). Their use in a distribution study showing that mouse erythrocytes and platelets are CR1-negative. *J. Immunol.* 140:3066-3072.
- 56 Baiu, D. C., Prechl, J., Tchorbanov, A., Molina, H. D., Erdei, A., Sulica, A., Capel, P. J., and Hazenbos, W. L. 1999. Modulation of the humoral immune response by antibody-mediated antigen targeting to complement receptors and Fc receptors. *J. Immunol.* 162:3125-3130.
- 57 Whipple, E. C., Ditto, A. H., Shanahan, R. S., Gatesman, J. J., Little, S. F., Taylor, R. P., and Lindorfer, M. A. 2007. Low doses of antigen coupled to anti-CR2 mAbs induce rapid and enduring IgG immune responses in mice and in cynomolgus monkeys. *Mol. Immunol.* 44:377-388.
- 58 Prechl, J., Tchorbanov, A., Horvath, A., Baiu, D. C., Hazenbos, W., Rajnavolgyi, E., Kurucz, I., Capel, P. J., and Erdei, A. 1999. Targeting of influenza epitopes to murine CR1/CR2 using single-chain antibodies. *Immunopharmacology* 42:159-165.
- 59 Prechl, J., Baiu, D. C., Horvath, A., and Erdei, A. 2002. Modeling the presentation of C3d-coated antigen by B lymphocytes: enhancement by CR1/2-BCR co-ligation is selective for the co-ligating antigen. *Int. Immunol.* 14:241-247.
- 60 Nimmerjahn, F., Bruhns, P., Horiuchi, K., and Ravetch, J. V. 2005. FcγRIIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity.* 23:41-51.
- 61 Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. 2006. Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 24:19-28.
- 62 Ravetch, J. V. and Bolland, S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19:275-290.
- 63 Takai, T. 2005. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J. Clin. Immunol.* 25:1-18.
- 64 Cambier, J. C. 1995. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* 155:3281-3285.
- 65 Yada, A., Ebihara, S., Matsumura, K., Endo, S., Maeda, T., Nakamura, A., Akiyama, K., Aiba, S., and Takai, T. 2003. Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by Fcγ. *Cell Immunol.* 225:21-32.
- 66 Daeron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., and Fridman, W. H. 1995. The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc γRIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity.* 3:635-646.
- 67 Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M. C., and Ravetch, J. V. 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc γRIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 369:340.

- 68 Ono, M., Bolland, S., Tempst, P., and Ravetch, J. V. 1996. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* 383:263-266.
- 69 Deo, Y. M., Graziano, R. F., Repp, R., and van de Winkel, J. G. 1997. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc gamma R-directed immunotherapies. *Immunol. Today* 18:127-135.
- 70 Fridman, W. H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J. L., and Sautes, C. 1992. Structural bases of Fc gamma receptor functions. *Immunol. Rev.* 125:49-76.
- 71 Minskoff, S. A., Matter, K., and Mellman, I. 1998. Fc gamma RII-B1 regulates the presentation of B cell receptor-bound antigens. *J. Immunol.* 161:2079-2083.
- 72 Rudge, E. U., Cutler, A. J., Pritchard, N. R., and Smith, K. G. 2002. Interleukin 4 reduces expression of inhibitory receptors on B cells and abolishes CD22 and Fc gamma RII-mediated B cell suppression. *J. Exp. Med.* 195:1079-1085.
- 73 Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J. R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J. G., Webster, P., Sautes, C., Mellman, I., and Fridman, W. H. 1992. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* 256:1808-1812.
- 74 Dijkstra, H. M., van de Winkel, J. G., and Kallenberg, C. G. 2001. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 22:510-516.
- 75 Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510-1512.
- 76 Heath, W. R. and Carbone, F. R. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1:126-134.
- 77 Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. 1999. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371-380.
- 78 Hamano, Y., Arase, H., Saisho, H., and Saito, T. 2000. Immune complex and Fc receptor-mediated augmentation of antigen presentation for in vivo Th cell responses. *J. Immunol.* 164:6113-6119.
- 79 Moore, T., Ekworomadu, C. O., Eko, F. O., MacMillan, L., Ramey, K., Ananaba, G. A., Patrickson, J. W., Nagappan, P. R., Lyn, D., Black, C. M., and Igietse, J. U. 2003. Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens. *J. Infect. Dis.* 188:617-624.
- 80 de Jong, J. M., Schuurhuis, D. H., Ioan-Facsinay, A., van, d., V, Huizinga, T. W., Ossendorp, F., Toes, R. E., and Verbeek, J. S. 2006. Murine Fc receptors for IgG are redundant in facilitating presentation of immune complex derived antigen to CD8+ T cells in vivo. *Mol. Immunol.* 43:2045-2050.

- 81 Akiyama, K., Ebihara, S., Yada, A., Matsumura, K., Aiba, S., Nukiwa, T., and Takai, T. 2003. Targeting apoptotic tumor cells to Fc gamma R provides efficient and versatile vaccination against tumors by dendritic cells. *J. Immunol.* 170:1641-1648.
- 82 Boruchov, A. M., Heller, G., Veri, M. C., Bonvini, E., Ravetch, J. V., and Young, J. W. 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J. Clin. Invest* 115:2914-2923.
- 83 Kalergis, A. M. and Ravetch, J. V. 2002. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:1653-1659.
- 84 Getahun, A., Dahlstrom, J., Wernersson, S., and Heyman, B. 2004. IgG2a-mediated enhancement of antibody and T cell responses and its relation to inhibitory and activating Fc gamma receptors. *J. Immunol.* 172:5269-5276.
- 85 Rawool, D. B., Bitsaktsis, C., Li, Y., Gosselin, D. R., Lin, Y., Kurkure, N. V., Metzger, D. W., and Gosselin, E. J. 2008. Utilization of Fc receptors as a mucosal vaccine strategy against an intracellular bacterium, *Francisella tularensis*. *J. Immunol.* 180:5548-5557.
- 86 Wernersson, S., Kleinau, S., and Heyman, B. 2000. Immune complex-mediated enhancement of antibody responses without induction of delayed-type hypersensitivity. *Scand. J. Immunol.* 52:563-569.
- 87 Adamova, E., Walsh, M. C., Gosselin, D. R., Hale, K., Preissler, M. T., Graziano, R. F., and Gosselin, E. J. 2005. Enhanced antigen-specific antibody and cytokine responses when targeting antigen to human FcGAMMA receptor type I using an anti-human FcGAMMA receptor type I-streptavidin fusion protein in an adjuvant-free system. *Immunol. Invest* 34:417-429.
- 88 Angyal, A., Szekeres, Z., Balogh, P., Neer, Z., Szarka, E., Virag, V., Medgyesi, D., Prechl, J., and Sarmay, G. 2010. CD16/32-specific biotinylated 2.4G2 single-chain Fv complexed with avidin-FITC enhances FITC-specific humoral immune response in vivo in a CD16-dependent manner. *Int. Immunol.* 22:71-80.
- 89 Wernersson, S., Karlsson, M. C., Dahlstrom, J., Mattsson, R., Verbeek, J. S., and Heyman, B. 1999. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. *J. Immunol.* 163:618-622.
- 90 Aydar, Y., Wu, J., Song, J., Szakal, A. K., and Tew, J. G. 2004. Fc gammaRII expression on follicular dendritic cells and immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in B cells. *Eur. J. Immunol.* 34:98-107.
- 91 Tew, J. G., Wu, J., Fakher, M., Szakal, A. K., and Qin, D. 2001. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol.* 22:361-367.
- 92 Heyman, B. 2000. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18:709-737.
- 93 Applequist, S. E., Dahlstrom, J., Jiang, N., Molina, H., and Heyman, B. 2000. Antibody production in mice deficient for complement receptors 1 and 2 can be

- induced by IgG/Ag and IgE/Ag, but not IgM/Ag complexes. *J. Immunol.* 165:2398-2403.
- 94 van, K. C. and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17.
- 95 Foy, T. M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J. E., and Noelle, R. J. 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* 14:591-617.
- 96 Young, L. S., Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., and Dawson, C. W. 1998. CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol. Today* 19:502-506.
- 97 Hasbold, J., Johnson-Leger, C., Atkins, C. J., Clark, E. A., and Klaus, G. G. 1994. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur. J. Immunol.* 24:1835-1842.
- 98 Grewal, I. S. and Flavell, R. A. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol. Rev.* 153:85-106.
- 99 Khanna, R., Cooper, L., Kienzle, N., Moss, D. J., Burrows, S. R., and Khanna, K. K. 1997. Engagement of CD40 antigen with soluble CD40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol.* 159:5782-5785.
- 100 Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- 101 Ridge, J. P., Di, R. F., and Matzinger, P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
- 102 Ballantyne, J., Henry, D. L., Muller, J. R., Briere, F., Snapper, C. M., Kehry, M., and Marcu, K. B. 1998. Efficient recombination of a switch substrate retrovector in CD40-activated B lymphocytes: implications for the control of CH gene switch recombination. *J. Immunol.* 161:1336-1347.
- 103 Hasbold, J., Hong, J. S., Kehry, M. R., and Hodgkin, P. D. 1999. Integrating signals from IFN-gamma and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a. *J. Immunol.* 163:4175-4181.
- 104 Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1:167-178.
- 105 Arpin, C., Dechanet, J., van, K. C., Merville, P., Grouard, G., Briere, F., Banchereau, J., and Liu, Y. J. 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268:720-722.
- 106 Diehl, L., den Boer, A. T., Schoenberger, S. P., van, d., V, Schumacher, T. N., Melief, C. J., Offringa, R., and Toes, R. E. 1999. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.* 5:774-779.

- 107 Rolph, M. S. and Kaufmann, S. H. 2001. CD40 signaling converts a minimally immunogenic antigen into a potent vaccine against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 166:5115-5121.
- 108 Sorensen, M. R., Holst, P. J., Steffensen, M. A., Christensen, J. P., and Thomsen, A. R. 2010. Adenoviral vaccination combined with CD40 stimulation and CTLA-4 blockage can lead to complete tumor regression in a murine melanoma model. *Vaccine* 28:6757-6764.
- 109 Dullforce, P., Sutton, D. C., and Heath, A. W. 1998. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat. Med.* 4:88-91.
- 110 Barr, T. A. and Heath, A. W. 1999. Enhanced in vivo immune responses to bacterial lipopolysaccharide by exogenous CD40 stimulation. *Infect. Immun.* 67:3637-3640.
- 111 Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M., and Steinman, R. M. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199:815-824.
- 112 Klechevsky, E., Flamar, A. L., Cao, Y., Blanck, J. P., Liu, M., O'Bar, A., Gouna-Deciat, O., Klucar, P., Thompson-Snipes, L., Zurawski, S., Reiter, Y., Palucka, A. K., Zurawski, G., and Banchereau, J. 2010. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 116:1685-1697.
- 113 Broomfield, S. A., van der Most, R. G., Prosser, A. C., Mahendran, S., Tovey, M. G., Smyth, M. J., Robinson, B. W., and Currie, A. J. 2009. Locally administered TLR7 agonists drive systemic antitumor immune responses that are enhanced by anti-CD40 immunotherapy. *J. Immunol.* 182:5217-5224.
- 114 Ferlin, W. G., von der, W. T., Cottrez, F., Ferrick, D. A., Coffman, R. L., and Howard, M. C. 1998. The induction of a protective response in *Leishmania* major-infected BALB/c mice with anti-CD40 mAb. *Eur. J. Immunol.* 28:525-531.
- 115 Hixon, J. A., Blazar, B. R., Anver, M. R., Wiltroth, R. H., and Murphy, W. J. 2001. Antibodies to CD40 induce a lethal cytokine cascade after syngeneic bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 7:136-143.
- 116 Kedl, R. M., Jordan, M., Potter, T., Kappler, J., Marrack, P., and Dow, S. 2001. CD40 stimulation accelerates deletion of tumor-specific CD8(+) T cells in the absence of tumor-antigen vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:10811-10816.
- 117 Dominguez, A. L. and Lustgarten, J. 2010. Targeting the tumor microenvironment with anti-neu/anti-CD40 conjugated nanoparticles for the induction of antitumor immune responses. *Vaccine* 28:1383-1390.
- 118 Cairing, J., Barr, T., and Heath, A. W. 2005. Adjuvanticity of anti-cD40 in vaccine development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7:73-77.
- 119 Frleta, D., Demian, D., and Wade, W. F. 2001. Class II-targeted antigen is superior to CD40-targeted antigen at stimulating humoral responses in vivo. *Int. Immunopharmacol.* 1:265-275.

- 120 Barr, T. A., McCormick, A. L., Carling, J., and Heath, A. W. 2003. A potent adjuvant effect of CD40 antibody attached to antigen. *Immunology* 109:87-92.
- 121 Hatzifoti, C. and Heath, A. W. 2007. CD40-mediated enhancement of immune responses against three forms of influenza vaccine. *Immunology* 122:98-106.
- 122 Francisco, J. A., Gawlak, S. L., and Siegall, C. B. 1997. Construction, expression, and characterization of BD1-G28-5 sFv, a single-chain anti-CD40 immunotoxin containing the ribosome-inactivating protein bryodin 1. *J. Biol. Chem.* 272:24165-24169.
- 123 Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242:423-426.
- 124 Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., and . 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:5879-5883.
- 125 Desplancq, D., King, D. J., Lawson, A. D., and Mountain, A. 1994. Multimerization behaviour of single chain Fv variants for the tumour-binding antibody B72.3. *Protein Eng* 7:1027-1033.
- 126 Tsumoto, K., Nakaoki, Y., Ueda, Y., Ogasahara, K., Yutani, K., Watanabe, K., and Kumagai, I. 1994. Effect of the order of antibody variable regions on the expression of the single-chain HyHEL10 Fv fragment in *E. coli* and the thermodynamic analysis of its antigen-binding properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:546-551.
- 127 Wang, W. W., Das, D., and Suresh, M. R. 2009. A versatile bifunctional dendritic cell targeting vaccine vector. *Mol. Pharm.* 6:158-172.
- 128 Merk, H., Stiege, W., Tsumoto, K., Kumagai, I., and Erdmann, V. A. 1999. Cell-free expression of two single-chain monoclonal antibodies against lysozyme: effect of domain arrangement on the expression. *J. Biochem.* 125:328-333.
- 129 Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. 1993. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:6444-6448.
- 130 Weissner, N. E. and Hall, J. C. 2009. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. *Biotechnol. Adv.* 27:502-520.
- 131 Boerman, O. C., van Schaijk, F. G., Oyen, W. J., and Corstens, F. H. 2003. Pretargeted radioimmunotherapy of cancer: progress step by step. *J. Nucl. Med.* 44:400-411.
- 132 Goshorn, S., Sanderson, J., Axworthy, D., Lin, Y., Hylarides, M., and Schultz, J. 2001. Preclinical evaluation of a humanized NR-LU-10 antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted cancer therapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 16:109-123.
- 133 Li, J. Y., Sugimura, K., Boado, R. J., Lee, H. J., Zhang, C., Duebel, S., and Pardridge, W. M. 1999. Genetically engineered brain drug delivery vectors: cloning, expression

and in vivo application of an anti-transferrin receptor single chain antibody-streptavidin fusion gene and protein. *Protein Eng* 12:787-796.

- 134 von Strandmann, E. P., Hansen, H. P., Reiners, K. S., Schnell, R., Borchmann, P., Merkert, S., Simhadri, V. R., Draube, A., Reiser, M., Purr, I., Hallek, M., and Engert, A. 2006. A novel bispecific protein (ULBP2-BB4) targeting the NKG2D receptor on natural killer (NK) cells and CD138 activates NK cells and has potent antitumor activity against human multiple myeloma in vitro and in vivo. *Blood* 107:1955-1962.
- 135 Yoshida, S., Kobayashi, T., Matsuo, H., Seki, C., Gosnell, W. L., Chang, S. P., and Ishii, A. 2003. T-cell activation and cytokine production via a bispecific single-chain antibody fragment targeted to blood-stage malaria parasites. *Blood* 101:2300-2306.
- 136 Iliades, P., Kortt, A. A., and Hudson, P. J. 1997. Triabodies: single chain Fv fragments without a linker form trivalent trimers. *FEBS Lett.* 409:437-441.
- 137 Dolezal, O., De, G. R., Walter, M., Doughty, L., Hattarki, M., Hudson, P. J., and Kortt, A. A. 2003. Single-chain Fv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: the residue at position 15 in the V(L) domain of the scFv-0 (V(L)-V(H)) molecule is primarily responsible for formation of a tetramer-trimer equilibrium. *Protein Eng* 16:47-56.
- 138 Power, B. E., Kortt, A. A., and Hudson, P. J. 2003. Generation of recombinant multimeric antibody fragments for tumor diagnosis and therapy. *Methods Mol. Biol.* 207:335-350.
- 139 Pack, P., Kujau, M., Schroeckh, V., Knapfer, U., Wenderoth, R., Riesenberger, D., and Pluckthun, A. 1993. Improved bivalent miniantibodies, with identical avidity as whole antibodies, produced by high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.)* 11:1271-1277.
- 140 Pluckthun, A. and Pack, P. 1997. New protein engineering approaches to multivalent and bispecific antibody fragments. *Immunotechnology* 3:83-105.
- 141 Kipriyanov, S. M., Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R. E., and Little, M. 1994. Recombinant single-chain Fv fragments carrying C-terminal cysteine residues: production of bivalent and biotinylated miniantibodies. *Mol. Immunol.* 31:1047-1058.
- 142 Liu, M., Wang, X., Yin, C., Zhang, Z., Lin, Q., Zhen, Y., and Huang, H. 2007. Targeting TNF-alpha with a tetravalent mini-antibody TNF-TeAb. *Biochem. J.* 406:237-246.
- 143 Rheinhecker, M., Hardt, C., Ilag, L. L., Kufer, P., Gruber, R., Hoess, A., Lupas, A., Rottenberger, C., Pluckthun, A., and Pack, P. 1996. Multivalent antibody fragments with high functional affinity for a tumor-associated carbohydrate antigen. *J. Immunol.* 157:2989-2997.
- 144 Borsi, L., Balza, E., Bestagno, M., Castellani, P., Carnemolla, B., Biro, A., Leprini, A., Sepulveda, J., Burrone, O., Neri, D., and Zardi, L. 2002. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int. J. Cancer* 102:75-85.

- 145 Braren, I., Greunke, K., Umland, O., Deckers, S., Bredehorst, R., and Spillner, E. 2007. Comparative expression of different antibody formats in mammalian cells and *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47:205-214.
- 146 Hu, S., Shively, L., Raubitschek, A., Sherman, M., Williams, L. E., Wong, J. Y., Shively, J. E., and Wu, A. M. 1996. Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain Fv-CH3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Res.* 56:3055-3061.
- 147 Li, S. L., Liang, S. J., Guo, N., Wu, A. M., and Fujita-Yamaguchi, Y. 2000. Single-chain antibodies against human insulin-like growth factor I receptor: expression, purification, and effect on tumor growth. *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252.
- 148 Kipriyanov, S. M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S., and Dubel, S. 1996. Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng* 9:203-211.
- 149 Cloutier, S. M., Couty, S., Tersikh, A., Marguerat, L., Crivelli, V., Pugnieres, M., Mani, J. C., Leisinger, H. J., Mach, J. P., and Deperthes, D. 2000. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. *Mol. Immunol.* 37:1067-1077.
- 150 Knight, J. B., Halperin, S. A., West, K. A., and Lee, S. F. 2008. Expression of a functional single-chain variable-fragment antibody against complement receptor 1 in *Streptococcus gordonii*. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:925-931.
- 151 Demangel, C., Zhou, J., Choo, A. B., Shoebridge, G., Halliday, G. M., and Britton, W. J. 2005. Single chain antibody fragments for the selective targeting of antigens to dendritic cells. *Mol. Immunol.* 42:979-985.
- 152 Prechl, J., Molnar, E., Szekeres, Z., Isaak, A., Papp, K., Balogh, P., and Erdei, A. 2007. Murine CR1/2 targeted antigenized single-chain antibody fragments induce transient low affinity antibodies and negatively influence an ongoing immune response. *Adv. Exp. Med. Biol.* 598:214-225.
- 153 Pape, K. A., Catron, D. M., Itano, A. A., and Jenkins, M. K. 2007. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity.* 26:491-502.
- 154 Roozendaal, R., Mempel, T. R., Pitcher, L. A., Gonzalez, S. F., Verschoor, A., Mebius, R. E., von Andrian, U. H., and Carroll, M. C. 2009. Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles. *Immunity.* 30:264-276.
- 155 Junt, T., Moseman, E. A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P. A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S. E., Shayakhmetov, D. M., Di Paolo, N. C., van, R. N., Mempel, T. R., Whelan, S. P., and von Andrian, U. H. 2007. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* 450:110-114.

- 156 Uto, T., Wang, X., Sato, K., Haraguchi, M., Akagi, T., Akashi, M., and Baba, M. 2007. Targeting of antigen to dendritic cells with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity. *J. Immunol.* 178:2979-2986.
- 157 Bachmann, M. F. and Zinkernagel, R. M. 1997. Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 15:235-270.
- 158 Vogelstein, B., Dintzis, R. Z., and Dintzis, H. M. 1982. Specific cellular stimulation in the primary immune response: a quantized model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79:395-399.
- 159 Aline, F., Brand, D., Pierre, J., Roingeard, P., Severine, M., Verrier, B., and mior-Poisson, I. 2009. Dendritic cells loaded with HIV-1 p24 proteins adsorbed on surfactant-free anionic PLA nanoparticles induce enhanced cellular immune responses against HIV-1 after vaccination. *Vaccine* 27:5284-5291.
- 160 Wilkinson, K. A., Belisle, J. T., Mincek, M., Wilkinson, R. J., and Toossi, Z. 2000. Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *J. Immunol. Methods* 235:1-9.
- 161 Nixon, D. F., Hioe, C., Chen, P. D., Bian, Z., Kuebler, P., Li, M. L., Qiu, H., Li, X. M., Singh, M., Richardson, J., McGee, P., Zamb, T., Koff, W., Wang, C. Y., and O'Hagan, D. 1996. Synthetic peptides entrapped in microparticles can elicit cytotoxic T cell activity. *Vaccine* 14:1523-1530.
- 162 Bourquin, C., Anz, D., Zwirok, K., Lanz, A. L., Fuchs, S., Weigel, S., Wurzenberger, C., von der, B. P., Golic, M., Moder, S., Winter, G., Coester, C., and Endres, S. 2008. Targeting CpG oligonucleotides to the lymph node by nanoparticles elicits efficient antitumoral immunity. *J. Immunol.* 181:2990-2998.
- 163 Hunter, S. K., Andracki, M. E., and Krieg, A. M. 2001. Biodegradable microspheres containing group B *Streptococcus* vaccine: immune response in mice. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185:1174-1179.
- 164 Rolink, A., Melchers, F., and Andersson, J. 1996. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S mu-S epsilon heavy chain class switching. *Immunity.* 5:319-330.
- 165 Kurucz, I., Titus, J. A., Jost, C. R., and Segal, D. M. 1995. Correct disulfide pairing and efficient refolding of detergent-solubilized single-chain Fv proteins from bacterial inclusion bodies. *Mol. Immunol.* 32:1443-1452.
- 166 French, R. R., Chan, H. T., Tutt, A. L., and Glennie, M. J. 1999. CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat. Med.* 5:548-553.
- 167 Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., and Tryggvason, K. 1995. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80:603-609.

- 168 Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R., Jones, M., and Jackson, D. G. 1999. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J. Cell Biol.* 144:789-801.
- 169 Schjetne, K. W., Fredriksen, A. B., and Bogen, B. 2007. Delivery of antigen to CD40 induces protective immune responses against tumors. *J. Immunol.* 178:4169-4176.
- 170 Clynes, R., Maizes, J. S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., and Ravetch, J. V. 1999. Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J. Exp. Med.* 189:179-185.
- 171 Schiller, C., Janssen-Graalfs, I., Baumann, U., Schwerter-Strumpf, K., Izui, S., Takai, T., Schmidt, R. E., and Gessner, J. E. 2000. Mouse FcgammaRII is a negative regulator of FcgammaRIII in IgG immune complex-triggered inflammation but not in autoantibody-induced hemolysis. *Eur. J. Immunol.* 30:481-490.
- 172 Snapper, C. M. and Paul, W. E. 1987. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944-947.
- 173 Stevens, T. L., Bossie, A., Sanders, V. M., Fernandez-Botran, R., Coffman, R. L., Mosmann, T. R., and Vitetta, E. S. 1988. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. *Nature* 334:255-258.
- 174 Schechter, B., Silberman, R., Arnon, R., and Wilchek, M. 1990. Tissue distribution of avidin and streptavidin injected to mice. Effect of avidin carbohydrate, streptavidin truncation and exogenous biotin. *Eur. J. Biochem.* 189:327-331.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék első helyen köszönetet mondani a kutatómunkám fáradhatatlan irányításáért és a rengeteg segítségért témavezetőmnek, Dr. Prechl Józsefnek, akire mindig számíthattam. Szeretném kifejezni hálámat Prof. Erdei Annának, az Immunológiai Doktori Iskola, illetve az ELTE Immunológiai Tanszék vezetőjének a kutatómunkám lehetővé tételéért és támogatásáért.

Köszönöm az állatok ápolásában nyújtott kitartó munkáját Mikesy Árpádnak, valamint a felkészült technikai támogatást Pásztor Mártának. Külön köszönöm minden közvetlen kollégámnak, Papp Krisztiánnak, Isaák Andreának, Herbáth Melindának, Balogh Andreának és Szittner Zoltánnak, a sok éven át is kitartó lelkes és pontos munkáját, a rengeteg segítséget és biztatást, amit kaptam, és persze a töretlen jó hangulatot. Végül, de nem utolsó sorban, pedig hálás vagyok a tanszék minden dolgozójának az építő kritikákért és a támogatásért.

Publikációs lista

A doktori értekezés alapját adó, elfogadott közlemények

Cikkek

- **Szekeres Z.**, Herbáth M, Szittner Z, Papp K, Erdei A, Prechl J. Modulation of the humoral immune response by targeting CD40 and FcγRII/III; delivery of soluble but not particulate antigen to CD40 enhances antibody responses with a Th1 bias. *Molecular Immunology* 2011 Sep 3. (közlésre elfogadva)
- **Szekeres Z.**, Herbáth M, Angyal A, Szittner Z, Virág V, Balogh P, Erdei A, Prechl J. Modulation of immune response by combined targeting of complement receptors and low-affinity Fc-receptors *Immunology Letters*, 2010 May 4; 130(1-2):66-73
- Prechl J, Molnár E, **Szekeres Z.**, Isaák A, Papp K, Balogh P, Erdei A. Murine CR1/2 targeted antigenized single-chain antibody fragments induce transient low affinity antibodies and negatively influence an ongoing immune response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007; 598:214-25.

Könyvfejezet

- **Szekeres Zs.**, Herbáth M, Prechl J.. Immune response modulation by targeted complexes based on streptavidin, *Biochemistry Research Updates*, Nova Sciences Publishers, 2011 ISBN 978-1-61209-700-8 (közlésre elfogadva)

Publikált absztrakt

- **Z. Szekeres**, M. Herbáth, Z. Szittner, A. Erdei, J. Prechl Modulation of immune response by combined targeting of complement receptors and low affinity Fcγ receptors. *European Journal of Immunology* 2009, S532 (poster session), PD11/6,

A témához kapcsolódó további közlemények

Cikkek

- Angyal A., **Szekeres Z.**, Balogh P., Neer Zs., Szarka E., Virág V., Medgyesi D., Prechl J., Sarmay G. CD16/32 specific biotinylated 2.4G2 single chain Fv complexed with avidin-FITC enhances FITC-specific humoral immune response in vivo in a CD16-dependent manner *International Immunology* 2010 Feb;22(2):71-80.

- Papp K., **Szekeres Z.**, Erdei A., Prechl J. Two-dimensional immune profiles improve antigen microarray-based characterization of humoral immunity. *Proteomics*, 2008 Jul ;8(14):2840-8.
- Papp K., **Szekeres Z.**, Terényi N., Isaak A., Erdei A., Prechl J. On-chip complement activation adds an extra dimension to antigen microarrays, *Molecular & Cellular Proteomics* 6: 133-140, 2007. Jan;6(1):133-40

Publikált absztraktok:

- Erdei A., Molnar E., Isaak A., **Szekeres Zs.**, Papp K., Prechl J. Novel roles of CR1/2 on B lymphocytes. *Molecular Immunology*, 44 (1-3): 166-166 Sp. Iss. 2007
- **Szekeres Zsuzsanna**, Isaak Andrea, Prechl József, Erdei Anna. Generation of a fusion protein containing DNA-like peptide and a single chain antibody. *FEBS Journal*, 272: 529-529 Suppl. 1 2005